

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
DÉPARTEMENT DE CHIMIE

**EFFETS DES LIPOPROTÉINES DE FAIBLE DENSITÉ
OXYDÉES SUR LES CELLULES OSTÉOBLASTIQUES**

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
PATRICK HAMEL

MAI 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je souhaite remercier PhD Robert Moreau, directeur du laboratoire de métabolisme osseux de l'UQAM. Robert m'a accueilli et immédiatement intégré au laboratoire suite à ma proposition d'y faire mon stage. Son enthousiasme pour la recherche, ses qualités de professeur incluant son approche humaine, calme et dynamique sont en partie responsables de mon désir de continuer mes études aux cycles supérieurs. En plus d'être disponible en tout temps, il m'a enseigné plusieurs méthodes de laboratoire et m'a orienté dans mon apprentissage tant au niveau de l'analyse de résultats que pour mes recherches bibliographiques.

En deuxième lieu, je remercie mes collègues Corine, Élie, Mathieu et Dominique. Ils ont accepté avec énergie de transmettre leur connaissance et de m'accompagner avec le sourire au laboratoire.

En troisième lieu, je désire remercier Denis Flipo, technicien au centre de recherche TOXEN. M. Flipo m'a fait profiter de son expertise pour l'utilisation du cytomètre en flux, le microscope confocale et la caméra CCD.

En quatrième lieu, je remercie PhD Catherine Jumarie qui m'a fournie de précieux conseils et permis l'accès à des appareils de son laboratoire.

En cinquième lieu, le personnel du laboratoire de PhD Louise Brissette m'a enseigné le métabolisme des lipoprotéines ainsi que les méthodes menant à leur isolation. Ils m'ont aussi généreusement fournis les lipoprotéines nécessaires à mes expérimentations.

Finalement, je veux remercier mon frère Sylvain, ma mère Lise et mon père Richard qui m'ont conseillés et soutenus de façon inestimable.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	viii
LISTE DES SYMBOLES.....	xii
RÉSUMÉ.....	xiii
PROBLÉMATIQUE.....	xv
CHAPITRE I. ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	1
1.1. LE SQUELETTE.....	1
1.1.1. Rôles et fonctions.....	1
1.1.2. Anatomie macroscopique.....	1
1.1.3. Caractéristiques physiques de l'os.....	3
1.1.4. Origines et fonctions des cellules osseuses	4
1.2. REMODELAGE OSSEUX.....	9
1.2.1. Cycle de remodelage osseux.....	9
1.2.2. Régulation systémique du remodelage et équilibre électrolytique.....	11
1.2.2.1. L'hormone parathyroïdienne et le calcitriol.....	11
1.2.2.2. Les stéroïdes sexuels.....	13
1.2.3. Régulation locale du remodelage.....	14
1.3. OSTÉOPOROSE.....	16
1.3.1. Diagnostic et traitements de l'ostéoporose.....	17
1.3.2. Facteurs de risque.....	18
1.4. RELATION OSTÉOPOROSE-ATHÉROSCLÉROSE.....	20
1.4.1. Études épidémiologiques.....	20
1.4.2. L'athérosclérose.....	21
1.4.2.1. Facteurs de risque.....	21
1.4.2.2. Progression de la maladie.....	21

1.5. LES LIPOPROTÉINES.....	23
1.5.1. Structure moléculaire.....	23
1.5.2. Classification et métabolisme.....	25
1.5.2.1. Chylomicrons.....	25
1.5.2.2. Lipoprotéines de très faible densité (VLDL).....	25
1.5.2.3. Lipoprotéines de faible densité (LDL).....	26
1.5.2.4. Lipoprotéines de haute densité (HDL).....	26
1.5.3. Internalisation.....	27
1.5.4. Récepteurs <i>scavengers</i>	29
1.5.5. Oxydation des LDL.....	30
1.6. EFFETS DES oxLDL SUR LES CELLULES.....	31
1.6.1. Effets des particules.....	31
1.6.2. Effets des composantes des particules.....	33
1.7. RÔLES DES oxLDL DANS LE DÉVELOPPEMENT DE L'OSTÉOPOROSE.....	35
1.8. OXYDORÉDUCTION CELLULAIRE.....	35
1.9. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	37
1.9.1. Hypothèses.....	37
1.9.2. Objectifs.....	38
1.9.3. Modèles cellulaires utilisés.....	38
CHAPITRE II. RÉSULTATS.....	40
2.1. CONTRIBUTION ET ÉTAPES.....	40
2.2. ARTICLE ACCEPTÉ POUR PUBLICATION	41
2.2.1. Abstract.....	42
2.2.2. Introduction.....	43
2.2.3. Materials and methods.....	46
2.2.4. Results.....	52
2.2.5. Discussion.....	58
2.2.6. References.....	64
2.2.7. Figure's legends.....	71
2.2.8. Figures.....	76
2.3. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES.....	85

2.3.1. Matériel et méthodes.....	85
2.3.2. Résultats.....	86
2.3.3. Discussion.....	97
CHAPITRE III : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	103
BIBLIOGRAPHIE.....	108

LISTE DES FIGURES

Figures

CHAPITRE I

A1	Représentation de l'os montrant l'emplacement et la structure de l'os cortical, des canaux Harvesiens, des ostéons, des vaisseaux sanguins et nerfs ainsi que l'os trabéculaire.....	2
A2	Schématisation cellulaire et moléculaire des interactions ostéoblastes-ostéoclastes.....	7
A3	Représentation des molécules impliquées dans la transduction du signal de la voie Wnt.....	9
A4	Schéma du cycle du remodelage osseux.....	11
A5	Régulation systémique du remodelage osseux.....	12
A6	Schéma des principales molécules extracellulaires, de leurs récepteurs, des voies intracellulaires et des facteurs de transcriptions impliquées dans la différenciation ostéoblastiques.....	16
A7	Répercussions physiologiques de la chute d'œstrogène.....	19
A8	Schéma d'une coupe transversale d'une artère avec une plaque athéromateuse.....	23
A9	Schéma tridimensionnel de la structure interne, membranaire et externe et des composantes moléculaires lipidiques et protéiques d'une particule de LDL.....	24
A10	Schéma des composantes moléculaires impliquées dans le cycle métabolique du cholestérol.....	27
A11	Schéma du captage, de la dégradation et de la régulation enzymatique suivant l'internalisation cellulaire des particules de LDL.....	28
A12	Régénération du glutathion, par l'utilisation du facteur réducteur NADPH, pouvant neutraliser et transformer le peroxyde d'hydrogène en eau.....	36

CHAPITRE II

1	Effects of oxidized LDL on MTT activity by osteoblastic cells.....	76
2	Effects of oxysterols on MG-63 cells.....	77

3	Effects of oxidized LDL on cell division of MG-63.....	78
4	Determination of lysosomal-dependent MTT activity.....	79
5	Effects of oxidized LDL on mitochondria mass, membrane potential and ROS production in MG-63 cells.....	80
6	Relationship between MTT activity and the intracellular levels of ROS.....	81
7	Association of flavoenzymes and NAD(P)H with MTT activity.....	82
8	Evaluation of the content of thiol-containing proteins in cells exposed to oxLDL.....	83
9	Effect of low concentrations of oxLDL on osteoblastic functions.....	84
2.3. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES		
S1	Électrophorèse des LDL utilisées.....	88
S2	Effet de concentrations croissantes de mox-LDL sur l'activité MTT des cellules ostéoblastiques MG-63.....	90
S3	Effet de concentrations croissantes de mox-LDL sur le nombre de cellules ostéoblastiques MG-63.....	91
S4	Effet de concentrations croissantes de lyso-phosphatidylcholine (LysoPC) sur les cellules MG-63.....	93
S5	Effet de concentrations croissantes de mox-LDL, de hox-LDL et de l'oxystérol 7 β -hydroxycholestérol sur la taille des cellules MG-63.....	94
S6	Évaluation de l'expression génique de LOX-1 par les cellules MG-63.....	95
S7	Évaluation de l'expression génique de NOX-4 par les cellules MG-63.....	96
S8	Effet de la vitamine E sur l'activité MTT des cellules MG-63 en présence de 7ketocholestérol	97
A13	Représentation de la NADPH oxydase.....	101
CHAPITRE III		
A14	Représentation des sources cytosolique et mitochondriales du NADPH.....	106

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AKT	Protéine kinase B
ANOVA	analyse de variance
AP-2	<i>Assembly Protein 2</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHT	butylhydroxytoluène
BMD	densité minérale osseuse
BMPs	protéines morphogénétiques osseuses
BSO	L-buthionine-SR-sulfoximine
BSA	albumine sérique de bovin
bp	<i>base pair</i>
CAD	<i>atherosclerosis and coronary artery disease</i>
CETP	protéine de transfert des esters de cholestérol
CEV	cellule endothéliale vasculaire
c-fms	récepteur du facteur stimulant la croissance des macrophages
COX2	cyclo-oxygénase-2
CYP	cytochrome
cdk	<i>cycline dependent kinase</i>
D.O.	densité optique
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMEM/F12	<i>Dulbecco's modified Eagle medium / nutrient mix F12</i>
DMSO	diméthyl sulfoxyde
EDTA	acide éthylène diamine tétra acétique
EGTA	acide bis (amino-éthyl) glycol éther NNN'N' tétracétique
eNOS	oxyde nitrique synthétase endothéliale

EREs	éléments de réponse aux œstrogènes
ERs	récepteurs œstrogéniques
ER α	récepteur œstrogénique α
ER β	récepteur œstrogénique β
ERK	kinase régulée par un signal extracellulaire
EtBr	bromure d'éthidium
EtOH	éthanol
FBS	sérum bovin fœtal
FGFs	facteurs de croissance des fibroblastes
FGF-2	facteur de croissance des fibroblastes de type 2
GPCR	récepteurs couplés aux protéines G
GSX	<i>glutathion peroxylase</i>
GTP	guanosine triphosphate
h	heure
HBSS	<i>HEPES-buffered saline solution</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HEPES	N-[2-Hydroxyéthyl]pipérazine-N'-[2-éthanesulfonic acid]
HMG CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A
hox-LDL	<i>highly oxidized low density lipoprotein</i>
HNE	4-hydroxynonenal
IGEPAL CO-630	2-[2-(4-nonylphénoxy)éthoxy]éthanol
IGFs	facteurs de croissance s'apparentant à l'insuline
IGF-1	facteur de croissance de type 1 s'apparentant à l'insuline
IgG	immunoglobuline de type G
IgM	immunoglobuline de type M
IL	interleukine
IP ₃	inositol 1,4,5-triphosphate
kDa	kiloDaltons
LDL	<i>low density lipoprotein</i>

LOX-1	récepteur <i>leptin-like oxidized</i> LDL
LPS	lipopolysaccharides
MAPK	protéine kinase activée par des agents mitogènes
M-CSF	facteur stimulant la croissance des macrophages
MDA	malondialdéhyde
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MeOH	méthanol
mox-LDL	<i>mildly oxidized low density lipoprotein</i>
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
nLDL	<i>native low density lipoprotein</i>
NO	oxyde nitrique
NOS	oxyde nitrique synthétase
NOX-4	NADPH oxydase-4
oxLDL	<i>oxidized low density lipoprotein</i>
OPG	ostéoprotégérine
pb	paire de bases
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes
pERK	ERK phosphorylée
PGE	prostaglandines de type E
PI3K	<i>phosphoinositide-3 kinase</i>
PKC	protéine kinase C
PTH	hormone parathyroïdienne
PTHrP	protéines s'apparentant à PTH
RANK	récepteur activant NF- κ B
RANKL	ligand du récepteur activant NF- κ B

LDL-R	récepteur de lipoprotéines de faible densité
ROS	espèces réactives de l'oxygène
RPE	<i>human retinal pigment epithelium</i>
RT	transcriptase inverse
SEM	erreur type sur la moyenne
SMAD	<i>Small Mothers Against Decapentaplegic</i>
SOD	<i>superoxide dismutase</i>
SR-	<i>scavenger receptor type-</i>
TBS-T	<i>tris buffered saline – tween</i>
TGF- β	facteur de croissance transformant β
TNF- α	facteur de nécrose tumorale α
U.V.	ultra-violets
VLDL	<i>very low density lipoproteins</i>
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i>
Wnt	<i>wingless-Int</i>

LISTE DES SYMBOLES

α	alpha
β	beta
μ	micro
μl	microlitre
mg	milligramme
ml	millilitre
n	nano

RÉSUMÉ

Plusieurs études rapportent que les personnes ayant un taux élevé de LDL et souffrants d'athérosclérose ont un risque accru de développer l'ostéoporose. Le remodelage osseux est effectué par deux types de cellules. Les ostéoblastes sont responsables de la synthèse de la matrice osseuse et de la régulation de sa dégradation par les ostéoclastes. L'altération de ce processus de renouvellement mène à diverses pathologies osseuses. L'ostéoporose est caractérisée par une faible densité minérale du tissu osseux et une microarchitecture de piètre qualité augmentant les risques de fractures. Les LDL en forte concentration dans le plasma des patients athérosclérotiques subissent une oxydation progressive, ce qui accroît leur réactivité et les rend athérogéniques. Ainsi, le principal objectif de l'étude a été d'évaluer les effets des LDL oxydés (oxLDL), des oxystérols 7 β -hydroxycholestérol et 7ketocholestérol et de la lysophosphatidylcholine (lysoPC) sur les pré-ostéoblastes humains MG-63. Considérant la variété des effets induits par les oxLDL qui étaient rapportés dans la littérature, nous avons émis l'hypothèse que la réponse des ostéoblastes à des concentrations croissantes de oxLDL ne serait pas monophasique. L'exposition des MG-63 à des hox-LDL (LDL fortement oxydées) et au 7 β -hydroxycholestérol pendant 48 heures produit une réponse de type hormèse lors des essais de viabilité cellulaire (activité réductrice MTT). Ainsi, il y a augmentation de l'activité réductrice cellulaire à faibles concentrations, effet perdu à fortes concentrations de hox-LDL et de 7 β -hydroxycholestérol. Les nLDL (LDL natives) et les mox-LDL (LDL moyennement oxydées) induisent aussi une stimulation de l'activité MTT. Toutefois, celle-ci n'est pas de type hormèse, car il n'y a pas de chute de l'activité MTT à fortes concentrations. Par contre, le 7ketocholestérol réduit l'activité MTT de manière dose-dépendante et la lysoPC n'influence pas l'activité MTT. Contrairement aux nLDL, la stimulation de l'activité MTT par les hox-LDL et les mox-LDL est plus élevée que l'augmentation du nombre de cellules et le taux de division cellulaire (déterminé par la réduction de fluorescence du CFSE mesurée au cytofluoromètre) dans les mêmes conditions. De plus, aucune différence significative de taille cellulaire, de masse mitochondriale ni de l'état lysosomal n'a été observée. Cependant, l'exposition aux hox-LDL provoque une augmentation du potentiel membranaire mitochondrial et la production de ROS. Nous avons comme hypothèse que la stimulation d'activité MTT reflétait les niveaux de ROS cellulaire. Toutefois, une incubation avec l'antioxydant NAC n'a pas d'effet sur l'activité MTT et l'agent pro-oxydant BSO, qui favorise une augmentation de ROS cellulaire, diminue plutôt l'activité MTT. Par contre, nous avons démontré l'expression de l'ARNm d'une flavoenzyme, la NADPH oxydase NOX-4. Cette enzyme est connue pour produire le radical superoxyde et être stimulée par les hox-LDL. L'inhibition des flavoenzymes avec le DPI a réduit l'activité MTT. De plus, l'analyse de l'autofluorescence des cellules au microscope confocale a permis de constater une augmentation de la fluorescence associée au NAD(P)H. Ces résultats démontrent que les enzymes réductrices dépendantes du NAD(P)H du type flavoenzymes, possiblement NOX-4, jouent un rôle dans l'augmentation du potentiel réducteur cellulaire. Nous voulions aussi vérifier l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de la production de ROS induit un stress oxydatif pouvant être dommageable pour les ostéoblastes. Cette hypothèse est appuyée par nos résultats montrant une diminution des groupements thiols réduits (SH-) intracellulaires, de l'activité phosphatase alcaline et l'augmentation de l'expression de l'ARNm de l'enzyme de détoxification métallothionéine

en présence de faibles concentrations de oxLDL. Nous proposons le mécanisme suivant : les oxLDL stimulent la production de ROS et des mécanismes intracellulaires associés aux thiols sont enclenchés afin de contrecarrer les effets de ces ROS. Il en découle un stress oxydatif qui oriente l'énergie cellulaire vers la production de NAD(P)H. Le NAD(P)H participe aux activités de flavoenzymes servant à régénérer les groupements thiols, mais il peut aussi être utilisé par la flavoenzyme NOX-4, qui contribue aussi à la production de ROS. Ainsi, les fonctions ostéoblastiques sont perturbées par le stress oxydatif et la réorientation de l'utilisation de l'énergie cellulaire, ce qui contribue à affaiblir la structure osseuse et mène à l'ostéoporose. En effet, les altérations de la prolifération, de la différenciation et de la migration cellulaire témoignent en ce sens.

Mots clés : Athérosclérose, Ostéoporose, oxLDL, essais MTT, ROS, NADPH, flavoenzyme, NADPH oxydase, NOX-4, stress oxydatif, thiols, métallothionéine

PROBLÉMATIQUE

Dans le monde, une femme sur trois et un homme sur cinq de plus de cinquante ans risque de souffrir d'ostéoporose (Melton et al., 1992; Melton et al., 1998). Les risques de développer l'ostéoporose, comme la plupart des pathologies, sont reliés à l'hérédité, à l'environnement et au mode de vie de chaque individu. Ainsi, plusieurs facteurs mènent au développement de l'ostéoporose. Parmi ceux-ci, la chute hormonale, la prise d'immunosuppresseurs, la sédentarité et, récemment, l'alimentation, sont considérés comme des facteurs favorisant l'émergence de la maladie.

Plusieurs études confirment que les personnes atteintes d'athérosclérose augmentent leur risque de souffrir d'ostéoporose (Banks et al., 1995; Jie et al., 1996; Parhami et al., 2001; Yamaguchi, 2002; Poli et al., 2003; Orozco, 2004). Il est généralement accepté que le développement de l'athérosclérose, tout comme l'ostéoporose, comporte une facette héréditaire, mais est aussi fortement influencé par l'environnement. Cette maladie de forte incidence est caractérisée par un haut taux de lipoprotéines de faible densité (LDL) sérique favorisant leur oxydation, la formation de plaques d'athéromes, le durcissement artériel et l'occurrence d'embolies. D'ailleurs, de fortes concentrations plasmatiques de LDL corrélient avec une diminution de la densité osseuse et les LDL oxydées (oxLDL) sont considérées comme étant un facteur commun dans le développement de l'athérosclérose et de l'ostéoporose.

Différentes équipes ont évalué l'effet *in vitro* des oxLDL sur la viabilité cellulaire et ont obtenu des résultats d'apparence contradictoires, variant en fonction des modèles cellulaires (Negre-Salvayre et al., 1990; Subroto et Ghosh, 1996; Auge et al., 1995; Colles et al., 2001; Chen et al., 2007). Généralement, les oxLDL induisent la prolifération, surtout des cellules du muscle lisse vasculaire (VMSC), puis l'apoptose, principalement des cellules endothéliales vasculaires (CEV), avec l'augmentation des concentrations, du temps d'incubation et du degré d'oxydation. L'exposition aux oxLDL est reconnue pour induire une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), phénomène associé au développement de plusieurs pathologies.

Notre laboratoire avait rapporté que les ostéoblastes possèdent les récepteurs et la machinerie d'internalisation des lipoprotéines. De plus, de nombreux arguments indiquent que les oxLDL ont accès à l'environnement osseux (Demer et Tintut, 2008). Les ostéoblastes sont ainsi susceptibles d'être en contact avec les particules et de subir des effets comparables aux autres modèles étudiés dans la littérature. D'ailleurs, Parhami et al (1999) a démontré qu'une diète riche en lipides et les oxLDL inhibent la différenciation ostéoblastique murine.

En considérant l'hétérogénéité des résultats concernant les effets des oxLDL sur la viabilité cellulaire, nous voulions caractériser leur impact sur les ostéoblastes. Nous croyions retrouver un effet typique de l'hormèse, soit une stimulation de la prolifération à faibles concentrations, et une perte de viabilité à fortes concentrations de oxLDL. Nous voulions documenter la signification physiologique de ces effets sur le métabolisme et les fonctions ostéoblastiques. Est-ce que l'éventuelle stimulation de la prolifération des ostéoblastes par de faibles concentrations de oxLDL, correspondant à celles des patients à risque de maladies vasculaires, représente un effet bénéfique pour le métabolisme osseux? Encore, cette stimulation témoigne-elle d'une perturbation de l'homéostasie cellulaire causée par les oxLDL et la production de ROS concomitante?

L'hormèse demeure un phénomène peu caractérisé. Il est important de mieux apprécier les conséquences des facteurs induisant ce type de réponse au niveau cellulaire et moléculaire. La meilleure compréhension du phénomène pourrait permettre d'élaborer des méthodes novatrices de prévention, de diagnostic et de traitement des pathologies pour lesquelles figurent des réponses de type hormèse. L'étude du métabolisme cellulaire en relation avec divers stress tels l'oxydation est au cœur des recherches en santé et constitue un domaine prometteur en expansion.

L'amélioration des connaissances reliant les habitudes de vie aux conséquences sur la santé s'avère nécessaire dans un contexte de vieillissement et d'élargissement de la population à risque, augmentant les coûts sociaux dont les frais médicaux. La médecine moderne, qui reflète le mode de vie de la société occidentale, est axée sur le traitement et non sur la

prévention. Le risque d'ostéoporose lié au mode de vie est estimé à environ 50 % par rapport à l'hérédité. Une meilleure connaissance des facteurs et leur influence sur le métabolisme osseux permettrait le développement de produits pharmaceutiques mais aussi l'adoption par la population de comportements plus sains.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 : Le squelette

1.1.1. Rôles et fonctions

Le squelette humain est composé de cartilage et de 213 os contenant 98 % du calcium corporel (Marieb, 1999). L'os, à l'origine, servait à réguler l'équilibre minéral de l'organisme. Au cours de l'évolution, il s'est transformé pour jouer différents rôles. En plus d'assurer l'homéostasie minérale phosphocalcique, ils exercent chez l'être humain, à différents degrés selon leur localisation, des fonctions de soutien, de lieu de production de cellules souches et hématopoïétiques (moelle osseuse), en plus de permettre le mouvement (points d'attache des muscles) et de protection des organes internes (Cooper, 1999; Currey, 2002).

1.1.2. Anatomie macroscopique

Les os peuvent être divisés en deux catégories : les os longs comme le fémur et le radius, et les os plats comme le crâne et la scapula (Stout et al., 1999). À partir de l'extrémité, l'os long est formé de l'épiphyse, la plaque de croissance, la métaphyse puis la diaphyse qui consiste en un long tube creux. Le tissu osseux interne, l'os spongieux, est fait de plaques et de barres trabéculaires interconnectées entourant la moelle. Il est entouré de l'endoste, qui couvre aussi les canaux de Volkman. Ceux-ci permettent aux vaisseaux sanguins de pénétrer l'os. La partie externe de l'os, l'os cortical, est plus dur et est recouvert par le périoste, qui est ancré dans l'os par les fibres de Sharpey's. Absent dans l'os spongieux, les ostéons représentent les unités structurales de l'os externe (Figure A1). Ils sont organisés en cylindres concentriques alignés formant un réseau tridimensionnel. Ils recouvrent les canaux harvesiens contenant les vaisseaux sanguins et les nerfs (Currey, 2002). Les os plats de la boîte crânienne, du sternum et des côtes sont formés d'os spongieux entre deux minces feuillets d'os cortical.

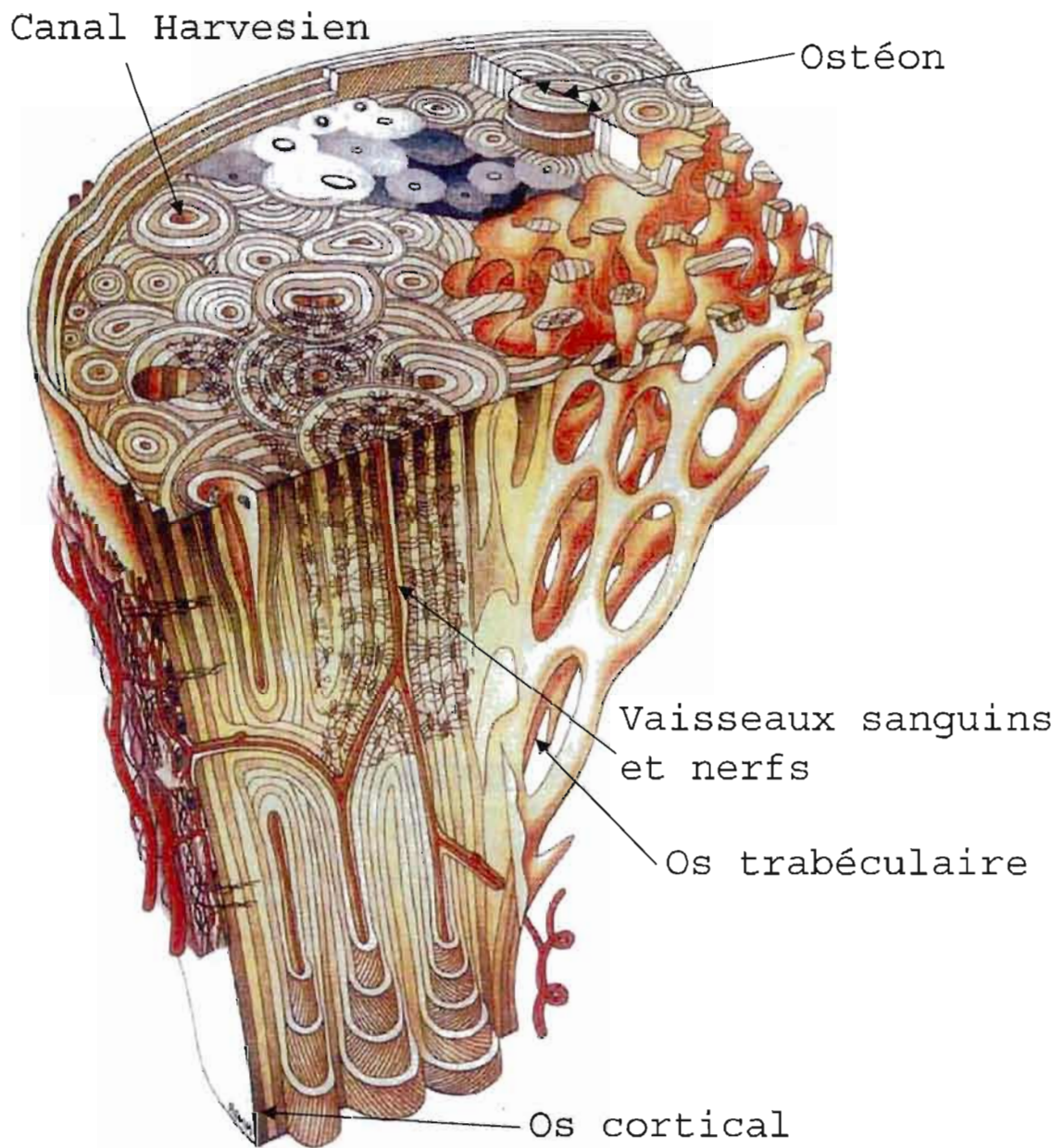


Fig. A1. Représentation de l'os montrant l'emplacement et la structure de l'os cortical, des canaux Harvesiens, des ostéons, des vaisseaux sanguins et nerfs ainsi que l'os trabéculaire.

1.1.3. Caractéristiques physiques de l'os

Pour remplir ses fonctions de protection, d'appui aux mouvements et de soutien, le tissu osseux doit composer avec différentes forces de flexion, torsion, compression et extension. Ainsi, la composition du tissu osseux et sa microarchitecture doit tenir en compte un maximum de flexibilité pour un maximum de dureté et de fermeté pour résister à une force. À cette fin, l'os est principalement constitué d'une matrice extracellulaire abondante formant le tissu osseux. Le collagène est la principale glycoprotéine de la matrice osseuse et celle-ci adopte une structure en trois brins tressés visibles au microscope optique. Sa composition suit la proportion de deux fibres $\alpha 1(I)$ pour une fibre $\alpha 2(CI)$. Elle est riche en glycine, proline et hydroxyproline. Les protéines non-collagéniques composent 10 à 15 % de la matrice. On compte parmi celles-ci les sialoprotéines (ostéopontine), les fibronectines et des intégrines (thrombospondine) impliquées dans l'adhésion cellule-matrice, en plus de l'ostéocalcine et l'ostéonectine qui aident à la minéralisation grâce à leurs affinités pour le collagène et le calcium, ainsi que l'albumine et des protéoglycanes. Ainsi, cette phase organique procure la flexibilité et l'élasticité de l'os. Finalement, l'eau est présente à 5 % et les lipides à 3% (Currey, 2002).

Suite à sa synthèse, la matrice osseuse est minéralisée. Cette étape procure la rigidité de l'os. Pour que le processus de minéralisation s'effectue, la concentration en ions doit être suffisamment élevée. L'ostéocalcine sécrétée par les ostéoblastes permet de concentrer localement le calcium extracellulaire. De plus, la sécrétion de vésicules matricielles riches en phosphatase alcaline permet l'accumulation de Ca^{2+} et de PO_4^- (Kim et al., 2004). La nucléation correspond à la précipitation de calcium et d'hydroxyde de phosphate en cristaux d'hydroxyapatite $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ avec un ratio de 1,66, conférant la rigidité de l'os (Landis, 1995; Currey, 2002). Les ions s'accumulent et lient les macromolécules jusqu'à composer de 50 à 70 % de l'os.

L'orientation des fibres de collagène, la masse et la taille de l'os, la densité des cristaux d'hydroxyapatite ainsi que l'architecture et l'agencement des composantes organiques-inorganiques font partie des caractéristiques primordiales de l'os (Burgeson et Nimni, 1991).

1.1.4. Origines et fonctions des cellules osseuses

Les ostéoblastes, responsables de la synthèse de la matrice et de la régulation des ostéoclastes qui dégradent la matrice osseuse, représentent les deux principaux types de cellules impliquées dans le remodelage. Les cellules souches de la moelle doivent se différencier en cellules mésenchymateuses avant de se différencier en ostéoblastes, puis en cellules bordantes ou en ostéocytes (Martin et al., 1989; Pittenger et al., 1999). Il est généralement accepté que les cellules de la famille monocyte/macrophage, dérivées de la lignée hématopoïétique, soient les principaux précurseurs des ostéoclastes. La maturation des ostéoclastes passe par la fusion de ses précurseurs en cellules multinucléées (Felix et al., 1990).

Le processus de dégradation par les ostéoclastes débute par la modification de la portion de leur membrane plasmique en bordure en brosse adjacente à la matrice (Boyle et al., 2003). La stimulation par RANKL (*Ligand of Receptor Activator of NF- κ B (nuclear factor kappa-B)*) du récepteur RANK (*Receptor Activator of NF- κ B*) des ostéoclastes active les GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*) associés à Rho/Rac (GTPases de la famille Rho *guanine-nucleotide binding proteins*). La stimulation de RANK par RANKL mène à la phosphorylation et l'assemblage de l'actine et des microtubules, et à la formation de podosomes polarisés (Simonet et Lacey, 1997). Le cytosquelette est couplé à des protéines d'adhésion transmembranaires telles les intégrines $\alpha\beta3$ qui elles-mêmes forment des liens avec le collagène, ce qui transmet des signaux intracellulaires qui mèneront à l'initiation de la résorption. Il y a ainsi fusion à la matrice, création d'un anneau périphérique de scellage et d'une chambre de digestion sous-jacente (lacune de *Howship*). Cette modification de la morphologie des ostéoclastes reflète leur rôle dans la dégradation de la matrice osseuse. L'anhydrase carbonique II permet la sécrétion d'acide chlorhydrique qui diminue le pH et enclenche la déminéralisation (Baron et al., 1986). En plus, il y a exocytose d'un ensemble d'enzymes protéolytiques telles la protéine cystéase cathepsine K, de collagénases, d'hydrolases, de phosphatases acides et des métalloprotéinases-9 et 13 qui participent à la dégradation de la matrice organique (Vaes, 1988). Ces cellules subissent l'apoptose après environ deux semaines (Vaes, 1988).

Les ostéoblastes sont des cellules cubiques, d'une durée de vie de trois mois, impliquées dans la synthèse de la matrice osseuse (Martin et al., 1989). Leur noyau, leur appareil de Golgi et leur réticulum endoplasmique, tous de grande taille, veillent à l'accomplissement de cette tâche exigeante énergiquement. Elles synthétisent les fibres de collagène et initient la minéralisation de l'os par le relargage de vésicules matricielles contenant la phosphatase alcaline et des ions (Anderson, 2003). Cette enzyme hydrolyse les esters phosphoriques inhibiteurs de la minéralisation. Les ostéoblastes matures subissent en majorité l'apoptose à la fin de la formation d'un nouveau tissu osseux, mais peuvent aussi se transformer en ostéocytes lorsqu'ils se retrouvent entourés par la matrice osseuse ou en cellules bordantes à la surface du tissu osseux. Les ostéoblastes sont reliés entre eux, avec les cellules bordantes et avec les ostéocytes par des canalicules.

L'action de dégradation et la survie des ostéoclastes sont en partie régulées par les ostéoblastes (figure A2). Leur action stimulatrice de l'ostéoclastogénèse est effectuée par la synthèse du récepteur de surface RANKL et la sécrétion de *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) (Boyle et al, 2003). La liaison du récepteur RANKL des ostéoblastes au RANK à la surface des ostéoclastes active p38, un membre de la famille *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK) ayant comme fonction d'effectuer la transduction de signaux cellulaires de stress au noyau en modifiant l'activité de plusieurs facteurs de transcription. La liaison de RANKL avec RANK recrute TRAF6 (*Tumor necrosis factor* (TNF) *receptor-associated factor* 6), ce qui active la voie des MAPK et NF- κ B (Teitelbaum et Ross, 2003). Cette activation et l'augmentation en calcium intracellulaire causée par l'activation du corécepteur ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), induisent la déphosphorylation et la translocation de NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) au noyau (Teitelbaum et Ross, 2003). Le facteur NFAT possède trois domaines structuraux permettant la régulation de sa localisation cellulaire, son association aux protéines AP-1 (facteurs de transcriptions) puis aux co-activateurs de la transcription (*p300*, *JAB1*) et la liaison aux promoteurs induisant l'expression des gènes de différenciation ostéoblastique. La stimulation du récepteur à M-CSF (c-FMS) ou des intégrines $\alpha\beta3$ active les voies de survie et de prolifération des ostéoclastes régulées par la *Phosphoinositide-3 kinase* (PI3K). La PI3K phosphoryle le phosphatidylinositol, un lipide membranaire impliqué dans plusieurs cascades

signalétiques et la protéine kinase B (AKT) impliquée dans la survie cellulaire. À l'inverse, les ostéoblastes inhibent l'activité ostéoclastique par la production d'ostéoprotégérine (OPG). Cette molécule soluble lie le récepteur RANKL et empêche la stimulation de RANK (figure A2) (Boyle et al, 2003; Teitelbaum et Ross, 2003).

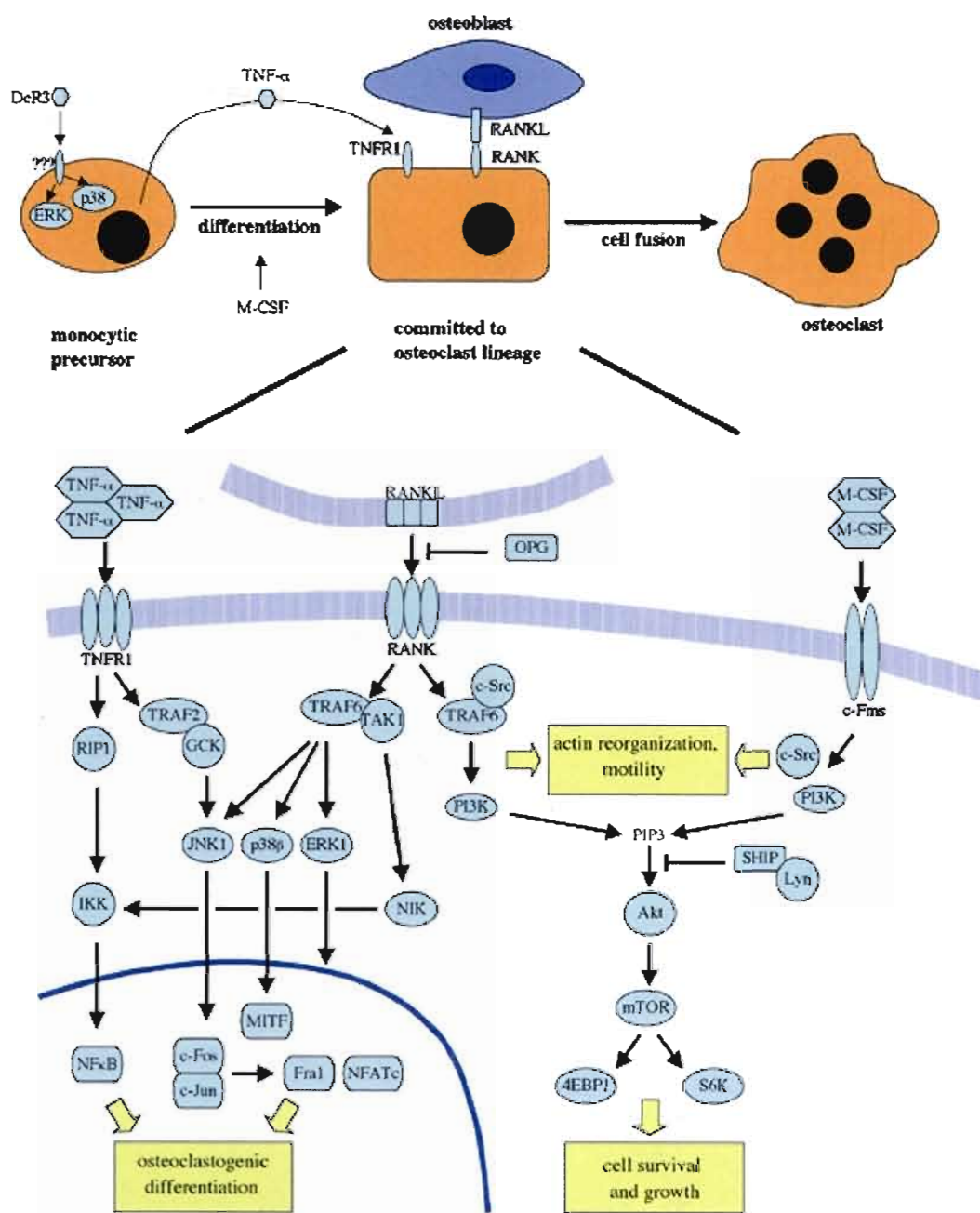


Fig. A2. Schématisation cellulaire et moléculaire des interactions ostéoblastes-ostéoclastes. La liaison de RANKL des ostéoblastes au récepteur RANK des ostéoclastes active la voie d'AKT, favorisant la survie des ostéocytes, et des MAP kinases via TRAF6, ce

qui induit l'activation et la translocation au noyau de p38, NFkB et autres facteurs de transcriptions favorisant la différenciation.

Lors de la synthèse matricielle, certains ostéoblastes se retrouvent entourés par la matrice osseuse et se transforment en ostéocytes (Aarden et al., 1994). Leur volume cellulaire se réduit tout comme le nombre d'organites. Ils forment alors un syncytium interconnecté par des canalicules remplis d'un liquide gélifié. Chaque cellule possède une cinquantaine de projections. Les forces appliquées à l'os provoquent des mouvements du liquide, ce qui stimule les connexines qui tapissent l'intérieur des canalicules de la membrane plasmique aux parois des conduits. Cette sensibilité mécanique leur permet de réagir en sécrétant la sclérostine destinée au recrutement des ostéoclastes et ostéoblastes. La sclérostine lie le récepteur *Frizzled* – Wnt et inhibe la voie Wnt (*wingless-Int*) (figure A3). Cette voie ubiquitaire est conservée au cours de l'évolution et impliquée dans le développement des tissus en activant des voies transcriptionnelles impliquées dans l'adhésion et les interactions cellulaires. Son inhibition chez les ostéoblastes empêche la sécrétion d'OPG et provoque l'action ostéoclastique (Aarden et al., 2004; Hill et al., 2005; Bellido, 2006). L'effet général est de favoriser le remodelage et le maintien d'un os de qualité. Les forces appliquées à l'os stimulent les intégrines, qui activent une tyrosine kinase intracellulaire Src (*sarcome kinase*) et la kinase Erk (*extracellular signal-regulated kinases*), qui joue un rôle central dans la division cellulaire, et favorise la survie des ostéocytes.

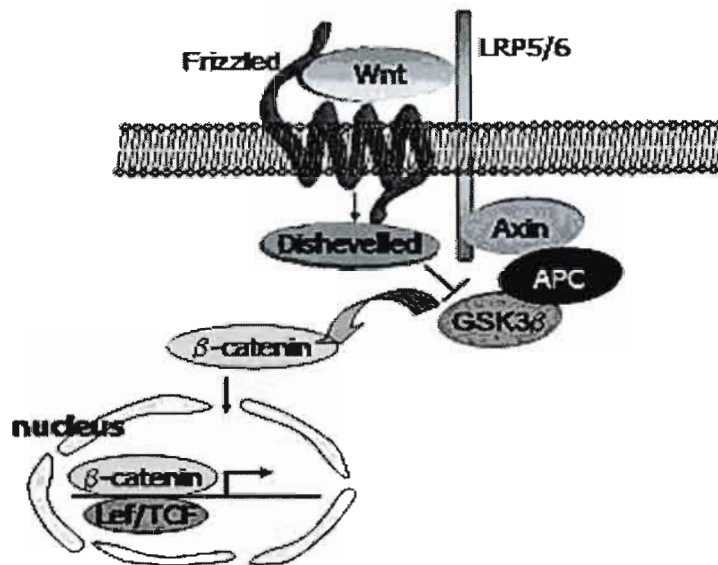


Fig. A3. Représentation des molécules impliquées dans la transduction du signal de la voie Wnt.

D'autres ostéoblastes se transforment en cellules bordantes. Celles-ci adoptent un métabolisme ralenti, avec peu d'organelles. Elles sont considérées comme pouvant jouer un rôle dans la délimitation d'un site précis de remodelage. Elles répondent à la stimulation ostéocytaire en dégradant une partie de la matrice, préparant le site pour l'action ultérieure des ostéoclastes. À l'état quiescent, elles protègent la surface de l'os et sont susceptibles de redevenir des ostéoblastes.

1.2 : Remodelage osseux

1.2.1. Cycle de remodelage osseux

Le remodelage osseux a comme fonction la prévention des cassures par le renouvellement du tissu contenant des micro-fractures et de rendre la disponibilité minérale rapidement accessible. Sa balance est négative à partir de vingt ans, et s'accroît selon certaines conditions, comme lors de la ménopause.

Le remodelage osseux peut être divisé en quatre phases (figure A4). Premièrement, l'activation de la résorption débute par le recrutement de cellules de la lignée monocyte/macrophage et leur fusion en cellules multinucléées. Les facteurs activateurs sont le RANKL, l'interleukine-1 et 6 (IL-1 et 6), le M-CSF, l'hormone parathyroïdienne (PTH) et la vitamine D3 (Felix et al., 1990; Ishimi et al., 1990). Un haut taux de facteur de croissance insuline-like (IGF-I), d'ostéocalcine et de facteur de croissance des fibroblastes (FGF-2) l'inhibe (Vaes, 1988). Ensuite, il y a résorption de la matrice par la sécrétion d'enzymes et d'acide chlorhydrique par les ostéoclastes. La dégradation de l'os spongieux forme les lacunes de *Howship*, tandis que des tunnels cylindriques sont formés dans le cortex. Les ostéoclastes subissent ensuite l'apoptose. Troisièmement, il y a réversion de l'action. En effet, l'os dégradé libère des ostéocytes et une foule de facteurs de croissance dont le TGF-beta (*transforming growth factor beta*), l'IGF-I et II, les BMPs (*bone morphogenic proteins*), le PDGF (*platelet-derived growth factor*) et FGF permettant le recrutement des pré-ostéoblastes (Mohan et Baylink, 1986). Ceux-ci prolifèrent dans la zone de remodelage (Canalis et al., 1988; Pittenger et al., 1999). Finalement, la formation est initiée par la sécrétion de la matrice collagèneuse par les ostéoblastes en processus de différenciation. Le relarguage de vésicules matricielles permet la minéralisation. Les ostéoblastes matures subissent alors l'apoptose, ou se transforment en ostéocytes ou en cellules bordantes.

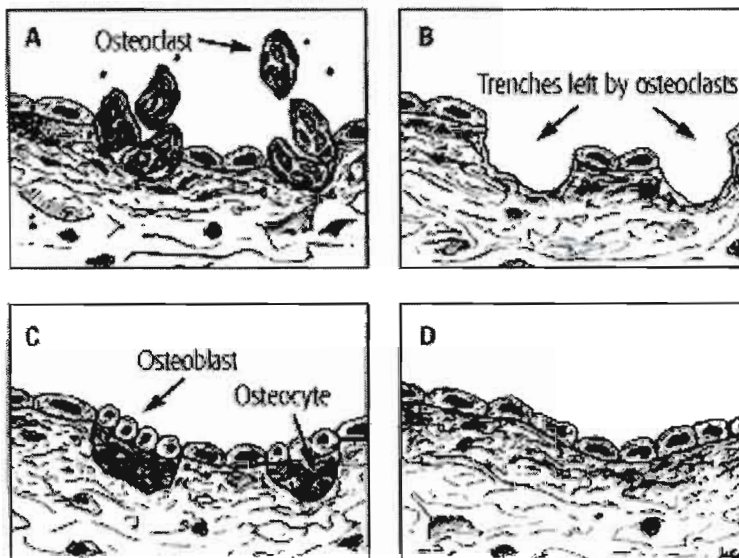


Fig. A4. **Schéma du cycle du remodelage osseux** (A) Activation des ostéoclastes (B) Apoptose des ostéoclastes et lacunes de Howship (C) Recrutement des ostéoblastes et synthèse de la matrice (D) Apoptose ou différenciation en cellules bordantes ou ostéocytes imbriquées dans la matrice nouvellement synthétisée.

1.2.2. Régulation systémique du remodelage et équilibre électrolytique

1.2.2.1. L'hormone parathyroïdienne et le calcitriol

Le maintien de l'équilibre électrolytique sérique est sous contrôle hormonal (figure A5). Un important régulateur est sous le contrôle des glandes parathyroïdes. En réponse à une chute des taux de calcium sériques, elles sécrètent la PTH dans le sang. Les cellules de la glande parathyroïde possèdent des senseurs calciques couplés à des protéines G qui activent la voie des MAPK et stimulent la synthèse de la pro-PTH. Celle-ci est clivée et sécrétée dans le sang sous forme mature. Ayant comme rôle d'augmenter la quantité de calcium sérique, elle agit sur les ostéoblastes, les cellules du rein et les cellules intestinales. En stimulant l'expression et la stimulation autocrine d'IL-6, la PTH augmente l'expression de la protéine RANKL par les ostéoblastes et réduit l'expression de l'ostéoprotégénine (OPG) soluble (McSheehy et Chambers, 1986). Avec le M-CSF, RANKL est une cytokine essentielle et suffisante à

l'ostéoclastogénèse (Boyle et al, 2003). De plus, la PTH favorise la prolifération des cellules hématopoïétiques, précurseurs des ostéoclastes (Whitfield, 2005). De plus, elle augmente l'activité de la 25-OHD₃-1 alpha-hydroxylase des tubules proximaux rénaux qui transforme la 25-hydroxyvitamine D₃ en sa forme active, le calcitriol ou 1-alpha 25-dihydroxyvitamine D₃ (Jones et al. 1996).

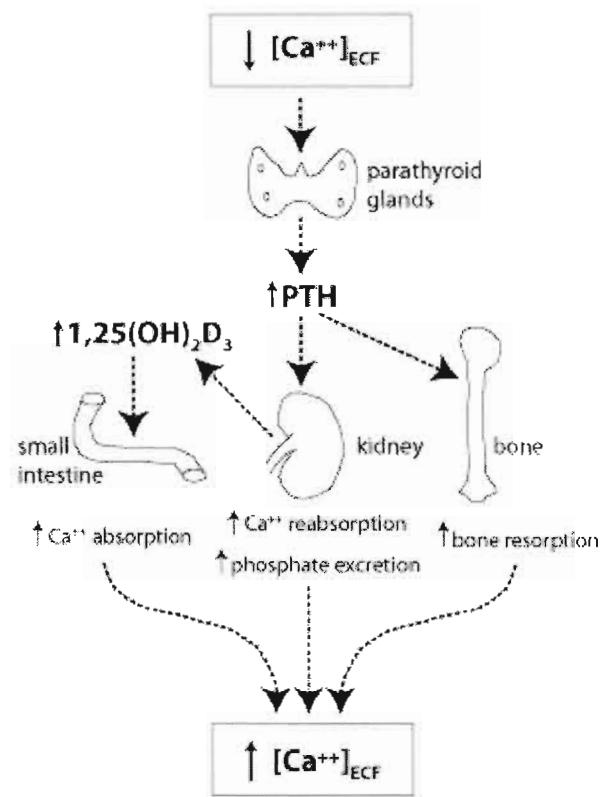


Fig. A5. **Régulation systémique du remodelage osseux.** L'expression-sécrétion de la PTH et du calcitriol (vitamine D3) augmente lors de diète faible en calcium. Les glandes parathyroïdes sécrètent la PTH qui stimule la dégradation de l'os et la synthèse du calcitriol par le rein. Le calcitriol migre dans l'intestin stimulant les processus d'absorption du calcium. L'effet général est d'augmenter la concentration calcique et diminuer la concentration en phosphate plasmatique.

Le calcitriol est lié et transporté dans le sang par une alpha-tubuline. Il agit sur les cellules intestinales et rénales à la manière des stéroïdes, après être libérée de l'alpha-tubuline (Owen et al., 1990). Il lie le récepteur de la vitamine D qui s'associe au facteur de transcription

récepteur rétinol-X. Une fois liés à l'élément de réponse à la vitamine D, ils enclenchent la transcription de gènes codant pour des transporteurs calciques et des facteurs de croissance cellulaire, ce qui stimule l'absorption intestinale et la réabsorption rénale du calcium (Owen et al., 1990; Yendt, 1994). En plus, le calcitriol accélère la différenciation ostéoblastique par la stimulation du facteur de transcription *cbfal* (*core binding factor alpha1*) liant une séquence consensus du promoteur de nombreux gènes de développement et de l'expression de l'ostéopontine et de l'ostéocalcine. En plus, il inhibe la sécrétion de PTH (Ducy et al., 1997). Ainsi, le calcitriol permet de maintenir l'os en santé (anabolisme) en plus d'accroître la calcémie (Jones et al. 1996).

1.2.2.2. Les stéroïdes sexuels

Les œstrogènes et les stéroïdes sexuels en général, jouent un rôle important dans l'équilibre osseux. Cauley démontre en 1986 que les femmes ayant un plus haut taux d'œstrogène endogène (estrone) ont une densité minérale osseuse (BMD) et une aire osseuse significativement plus élevées, indépendamment de l'âge, du nombre d'années depuis la ménopause et de l'obésité. De plus, la chute hormonale est connue comme accélérant le remodelage et perturbant l'équilibre calcique sérique (Heaney et al, 1978; Steiniche et al., 1985; Wronsky et al., 1985). En effet, les études au niveau moléculaire démontrent que l'œstrogène stimule l'expression d'OPG via l'activation du récepteur aux oestrogènes α (ER α) (Saika et al., 2001), inhibant ainsi la liaison RANKL-RANK, et réduit la sensibilité ostéoclastique à l'IL-1 (Sunyer et al., 1999). En plus, l'œstrogène provoque directement l'apoptose ostéoclastique via le récepteur nucléaire ER α (Kameda et al., 1997; Shiokawa et al., 1997). De plus, il a été démontré que l'estrogène inhibe la sécrétion par les cellules immunitaires, stromales et ostéoblastiques de cytokines inflammatoires stimulants l'activité ostéoclastique comme l'IL-1, IL-6 et IL-7 (Girasole et al., 1992) et des enzymes lysosomales par les ostéoclastes (Kremer et al., 1995). Toutefois, leurs effets varient en fonction du taux d'expression des deux récepteurs (α et β) présents dans les ostéoblastes et les ostéoclastes. La proportion de ces récepteurs varie selon le degré de différenciation cellulaire et forment des homo ou des hétérodimères. Leur effet dépend surtout du faible taux α/β , qui permet de moduler NF- κ B et *c-fos*. Ceux-ci inhibent l'apoptose des ostéoblastes et réduisent

l'expression de RANKL (Tomkinson et al., 1997). Ainsi, la masse osseuse est favorisée. De concert avec la PTH, ils augmentent les taux d'IGF et de TGF- β qui stimulent le recrutement et la prolifération des ostéoblastes.

1.2.3. Régulation locale du remodelage

Plusieurs facteurs agissent localement sur les ostéoclastes et les ostéoblastes (Canalis, 1998). Parmi ceux-ci les prostaglandines inhibent la synthèse d'OPG et stimulent celle de RANKL par les ostéoblastes, ce qui favorise l'ostéoclastogénèse. La prolifération et la progression des cellules mésenchymateuses pluripotentes vers la lignée ostéoblastique sont provoquées par le PDGF. Celui-ci lie et active les récepteurs à PDGF, ce qui provoque une cascade de phosphorylation impliquant les MAPK puis les proto-oncogènes membres de la famille de facteurs de transcription à expression précoce immédiate c-fos et c-jun, ainsi que l'expression de d'autres régulateurs du cycle cellulaire (histones, cdk (*cycline dependent kinase*), etc.) (Pittenger et al., 1999). L'association des proto-oncogènes c-fos et c-jun forme le facteur de transcription *activator protein-1* (AP-1) qui lie le promoteur de gènes avec la séquence de liaison à AP-1 et active la transcription de protéines impliquées dans la différenciation et la prolifération ostéoblastique (Dijke et al., 2003).

En plus d'être chémotaxiques pour les ostéoblastes, la BMP2, l'IL-11, l'IL-6 et le TGF- β , membres de la famille TGF (*Transforming/Tumor growth factor*), provoquent la phosphorylation et l'activation de la protéine SMAD (*Small Mothers Against Decapentaplegic*). Tout comme les interactions du collagène matriciel avec les N-cadhérines ou les intégrines $\alpha 1 \beta 1$ reliées au cytosquelette, les TGF activent la voie des MAPKinases (Zaidi et al., 2002) (figure A6). La phosphorylation subséquente des facteurs de transcription cbfa1, Runx2 (*runx related transcription factor 2*), ostérix (de la famille Sp1, en aval de Runx2), Dlx2 (*distal-less homeobox 2*) et d'autres protéines d'homéodomaines (liant des gènes codant des protéines qui régulent le développement de l'organisme) (Nakashima et al., 2002; Hassan et al., 2004; Paredes et al., 2004) couplée à l'activation de la voie Wnt/ β -caténine (Hill et al., 2005; Hu et al., 2005) mène à la différenciation ostéoblastique (Ducy et al., 1997; Yamaguchi et al., 2000; Paredes et al., 2004). La variation des taux de cadhérines

représente le degré de différenciation des cellules mésenchymateuses. Le facteur de transcription Runx2 cible et active la transcription des gènes associés à la croissance et la différenciation ostéoblastique, comme l'ostéocalcine et l'ostéopontine, mais aussi au remodelage, comme la collagénase 3 et RANKL (Paredes et al., 2004). L'ostéopontine peut aussi activer les ostéoclastes en liant l'intégrine $\alpha\text{v}\beta3$ (Miyauchi et al., 1991). L'expression des marqueurs CD44, collagène, TGF- β , ostéopontine, phosphatase alcaline, sialoprotéine osseuse, ostéocalcine, récepteur à PTH/PTHrp (PTH *related peptide*) et collagénase est stimulée ou réprimée à mesure que progresse la différenciation des cellules mésenchymateuses, en ostéoprogéniteurs, pré-ostéoblastes, ostéoblastes matures puis en ostéocytes (Canalis, 1993; Dijke et al., 2003). Normalement, l'expression de la phosphatase alcaline et des récepteurs à PTH/PTHrp augmente avec la différenciation des ostéoprogéniteurs, puis diminue lors de la transition ostéocytaire. L'ostéocalcine est fortement exprimée au cours de cette dernière phase (Dijke et al., 2003). La synthèse de la matrice osseuse est stimulée par l'activation des facteurs de transcription FosB, Fra-1 et Dlx-5. Les facteurs de transcription Fra-1 et Dlx-5 enclenchent la transcription des gènes codant pour les sialoprotéines et l'ostéocalcine impliquées dans la minéralisation (Hassan et al., 2004). Les niveaux d'expression des protéines impliquées dans la différenciation et la formation de la matrice sont ajustés au cours de la différenciation par l'interaction des facteurs de transcription avec des co-régulateurs protéiques comme ceux qui remodelent la chromatine (p300, HAT) (Dijke et al., 2003).

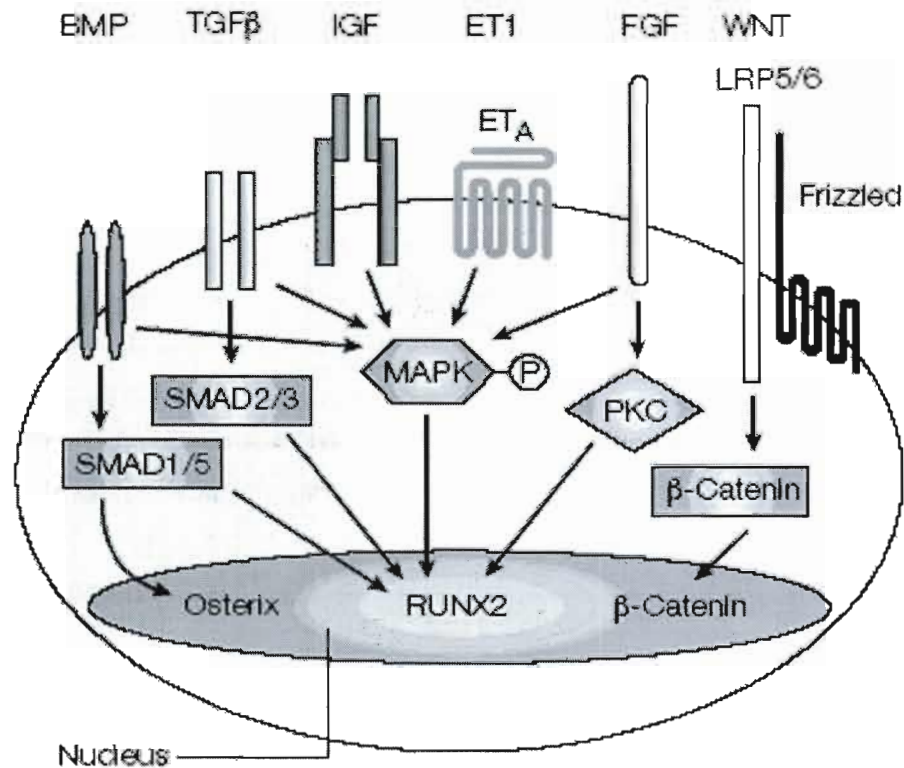


Fig. A6. Schéma des principales molécules extracellulaires, de leurs récepteurs, des voies intracellulaires et des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation ostéoblastiques.

1.3 : Ostéoporose

L'ostéoporose se décrit comme une augmentation graduelle de la fragilité et de la porosité osseuse, causée par une perte de masse osseuse et une détérioration de la microarchitecture osseuse. L'affection se traduit par une augmentation du risque de fractures osseuses lors de chute. Selon l'OMS (Organisation mondiale de la santé), la maladie se caractérise *par une densité osseuse, mesurée au rachis lombaire et/ou à l'extrémité supérieure de la hanche, abaissée de plus de 2,5 écarts-type au dessous de la moyenne des jeunes adultes (T score ≤ -2,5)*. Le traitement associé doit tenir en compte tous les risques et antécédents en plus du résultat T score. Au Canada, des coûts annuels de 1,3 milliards de dollars sont rattachés à son traitement et aux fractures associées (Johnell, 2001). Avec l'âge, l'os subit en général une

diminution de sa masse et de sa qualité résultant de plusieurs facteurs. Avec le temps, l'activité ostéoclastique augmente par rapport à celle des ostéoblastes; il y a adipogénèse de la moelle osseuse et les ostéocytes subissent une apoptose prématurée. Après 50 ans, une femme sur quatre et un homme sur huit risquent de souffrir d'ostéoporose (*NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis*, 2001). Elle est surnommée l'épidémie silencieuse, considérant qu'elle est asymptotique au début, mais n'en demeure pas moins dangereuse; une femme peut perdre jusqu'à 20 % de sa masse osseuse au cours des cinq ans suivant la ménopause. Les fractures de la hanche (en haut du col du fémur), vertébrales et des poignets sont les plus fréquentes (Beaudoin et al., 1996; Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé, 2001; Cummings et Melton, 2002).

1.3.1. Diagnostic et traitements de l'ostéoporose

Des méthodes de diagnostic de l'ostéoporose sont disponibles. Premièrement, les rayons X peuvent donner une idée de l'état général de l'os (fractures et déformations). Toutefois, la plupart du temps, ils sont effectués trop tard, soit après la perte osseuse et le début des fractures. Deuxièmement, un nouveau type de rayon X (DXA) permet de comparer l'indice de densité minérale osseuse (BMD), qui corrèle avec les risques de fractures, avec celui d'un modèle sain. Un *T score* est associé au résultat BMD de l'ostéodensitomètre, ce qui permet de standardiser l'approche et de poser un diagnostic. Finalement, des mesures de marqueurs du métabolisme osseux sont élaborées. Le plus souvent, l'ostéocalcine et la phosphatase alcaline sérique ou les télopeptides C-terminaux urinaires provenant de la dégradation du collagène sont mesurés (Woitge et Seibel, 2001; Kanis, 2002).

Les mesures préventives ciblent principalement l'alimentation et l'augmentation de l'exercice physique. Parmi les mesures curatives, les β -bloqueurs et les statines (inhibiteur de l'enzyme limitante de la voie de synthèse du cholestérol, l'HMG-CoA réductase ou l'hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase), qui stimulent la différenciation des ostéoblastes, font partis des anciens traitements. Récemment, l'arrivée des biphosphonates (*alendronate*®, *risedronate*®) qui inhibent la farnesyl pyrophosphate synthase et la dissolution de l'hydroxyapatite, ont révolutionné les traitements. En effet, l'inhibition de l'HMG-CoA

réductase empêche la prénylation de protéines importantes pour l'activation des GTPases Ras, Rho et Rac. Celles-ci contrôlent la morphologie, l'arrangement du cytosquelette, le transport des lysosomes et la formation de la bordure en brosse indispensables à l'action de dégradation et à la survie ostéoclastique. (Hosking 1998; Raven et al., 2002; Zhang et Casey, 1996; Ridley et al., 1992). En plus, les biphosphonates agissent en analogues des pyrophosphates et sont convertis en analogues de l'ATP non hydrolysables. La chaîne latérale associée à chaque médicament procure différents degrés d'inhibition enzymatique. De plus, le radical P-C-P de la molécule lui confère une affinité pour la matrice osseuse, la protégeant de la digestion ostéoclastique, mais nuisant à la régénération de la matrice osseuse (Fleisch, 1997). Aussi, les inhibiteurs de cathepsine K (cystéine protéase unique aux ostéoclastes) comme les analogues de bis(hydrazide) et de pompe à protons comme les dérivés de prazole, qui diminuent la dégradation tout en maintenant la formation, sont parmi les innovations les plus intéressantes. Ils provoquent toutefois des lésions cutanées et favorisent les infections respiratoires virales (Yang et al., 2006). Administré quotidiennement, le raloxifène® agit comme agoniste de l'œstrogène en activant les récepteurs ER sélectivement sur le tissu osseux, ce qui provoque une augmentation significative de la BMD, sans effet secondaire majeur (Delmas, 2005; Khosla, 2006). Toutefois, l'effet de chaque médicament demeure incomplet face aux deux processus du remodelage osseux, provoque des effets indésirables et doit être administré selon le stade de la maladie et les exigences du patient.

1.3.2. Facteurs de risque

La masse osseuse moins importante et la chute hormonale après la ménopause (figure A7) sont responsables du risque plus élevé de souffrir d'ostéoporose chez les femmes. L'hérédité joue aussi un rôle dans la progression de la maladie. En effet, les gènes codant pour le collagène sont polymorphiques dans la population. Être porteur de variants alléliques des gènes codant pour le collagène de type I α 1 ayant une mutation des nucléotides guanine pour thymine du site de liaison au facteur de transcription Sp1 du promoteur augmente les risques de souffrir d'ostéoporose (Grant et al., 1996). En plus, le risque varie en fonction de l'allèle du récepteur à la vitamine D reçu. Il existe un site clivé par l'enzyme de restriction BmsI

entre les exons 8 et 9 du gène codant le récepteur. Un allèle du gène du récepteur ne possède pas ce site. Les personnes porteuses de cet allèle ont un risque plus élevé de développer l'ostéoporose (Morrison et Tokita, 1994). Être caucasien, souffrir de maladies du foie, du rein, de l'intestin, la prise d'immunosuppresseurs (les glucocorticoïdes diminuent le ratio OPG/RANKL, inhibent l'ostéoblastogénèse (Jones et al. 1996)), de diurétiques, un déséquilibre hormonal prolongé : hypogonadisme, puberté tardive et menstruations irrégulières sont d'autres facteurs difficilement contrôlables. Parmi les risques évitables de développer cette affection dégénérative, on compte la sédentarité, l'usage de la cigarette, de l'alcool, la malnutrition, une alimentation pauvre en calcium, en vitamine D et trop riche en protéines animales, une perte de poids importante et, reconnu depuis récemment, souffrir d'athérosclérose (Salamone et al., 1999; Munger et al., 1999; Sahota, 2000; Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé, 2001).

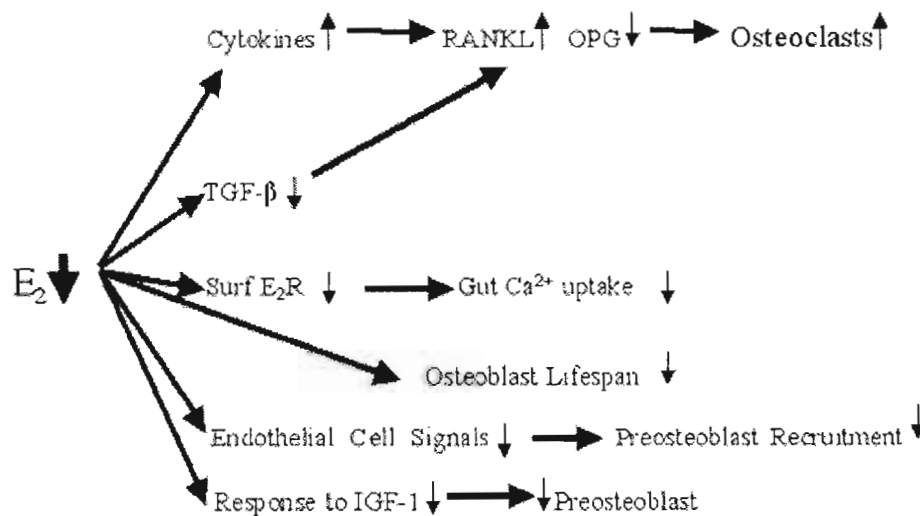


Fig A7. **Répercussions physiologiques de la chute d'œstrogène (E2).** Entre autres, il y a une augmentation de l'activité ostéoclastique ainsi qu'une diminution de l'absorption intestinale du calcium, de la survie, du recrutement et du nombre des cellules pré-ostéoblastiques.

1.4 : Relation ostéoporose-athérosclérose

1.4.1. Études épidémiologiques

Des études démontrent un lien entre le développement de l'ostéoporose et de l'athérosclérose. Après correction des résultats avec le facteur âge, les femmes souffrant d'athérosclérose possèdent une BMD inférieure de 7 % aux femmes non-athérosclérotiques, pour un même taux de PTH sanguin (Jie et al., 1996). En plus, Yamaguchi (2002) indique que les taux sanguins de LDL (lipoprotéines de faible densité) et de HDL (lipoprotéines de haute densité) sont, respectivement, inversement et positivement corrélés à la BMD de femmes post-ménopausées japonaises. Poli et al. (2003) démontrent que chez 1303 femmes post-ménopausées, les risques de faible BMD sont accrus lorsque les taux de LDL sanguin dépassent 1,6mg/ml (profil lipidique athérogénique). Un profil lipidique athérogénique (% LDL sérique > 1,6 mg/ml, versus optimal : < 1 mg/ml) est associé à un T *score* ostéoporotique (< -2,5 versus normal : > -1) chez des femmes ayant un embonpoint et récemment ménopausées (Orozco, 2004).

L'étude épidémiologique de Banks et al. (1995) démontre que les femmes ayant une calcification de l'aorte ont un risque plus élevé d'avoir une BMD fémorale plus faible. De plus, Sinnott (2006) montre que les femmes d'âge similaire atteintes d'ostéoporose ont une calcification coronarienne plus importante. Adamie et al. (2004) démontrent que des taux élevés de tissus adipeux et du ratio LDL/HDL sont reliés à une BMD plus faible chez des sujets en santé. Des souris C57BL/6 nourries avec une diète athérogénique riche en lipides ont un taux d'ostéocalcine, un taux minéral osseux et une BMD fémorale et vertébrale lombaire plus faible à sept mois que les souris nourries normalement (Parhami et al 2001). Les études de Uyama (1997) et von der UP (1999) associent aussi le risque de faible BMD aux maladies cardio-vasculaires.

1.4.2. L'athérosclérose

L'athérosclérose est décrite comme une artériosclérose, ou dégénérescence fibreuse artérielle, accompagnée de dépôts lipidiques appelés athéromes. L'épaississement de la paroi des artères et l'accumulation de plaques athéromateuses mènent à la perte d'élasticité et à l'obstruction des vaisseaux sanguins. C'est un problème de santé publique majeur. En occident, les affections vasculaires représentent la principale cause de mortalité (Watson et Lusic, 1995).

1.4.2.1. Facteurs de risque

L'usage du tabac, la sédentarité, le stress, la contraception orale, l'alcoolisme, une alimentation riche en sel, l'hypertension artérielle, un taux de LDL/HDL élevé et l'obésité sont des facteurs de risque importants, mais évitables. D'autre part, les antécédents familiaux d'accidents cardiovasculaires, le genre masculin, le diabète, l'hypercholestérolémie familiale et la goutte sont plus difficilement traitables, mais favorisent aussi le développement de la maladie (Watson et Lusic, 1995).

1.4.2.2. Progression de la maladie

Dès la naissance, les artères commencent leur processus de vieillissement. L'addition des facteurs de risque accélère la détérioration artérielle. Un taux de LDL trop élevé engendre des dépôts lipidiques qui infiltrent l'intima des artères (figure A8). Les monocytes/macrophages tentent, via leurs récepteurs *scavenger*, de phagocyter et détruire les particules lipidiques en sécrétant des radicaux libres (Bittner, 1998). Ainsi, lorsque les LDL sont trop abondantes, les macrophages se gorgent de cholestérol, de triglycérides et d'autres lipides, ce qui les transforme en cellules spumeuses non fonctionnelles. Ils contribuent à la formation des LDL oxydées (oxLDL) qui activent davantage la réponse immunitaire. Il en résulte une réponse inflammatoire impliquant l'expression d'endothéline, de la cyclo-oxygénase, de protéases, d'oxyde nitrique synthase (NOS), de facteurs de croissance, de MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) et de molécules d'adhésion (Bittner, 1998). S'en suivent la

séparation des jonctions intercellulaires et le passage subendothélial des monocytes/macrophages. L'abondance de cytokines et le dérèglement de l'homéostasie de l'intima entraînent la prolifération des cellules musculaires lisses et l'apoptose des cellules endothéliales, macrophages et cellules T (Crisby et al., 1997). Il se forme alors un noyau nécrotique composé de cellules spumeuses, apoptotiques, de cristaux de calcium et de lipides oxydés entourés de cellules musculaires lisses et de cholestérol. La membrane élastique interne finit par se rompre. Avec le temps, une portion des cellules endothéliales se transdifférentient en cellules ressemblant à des ostéoblastes et peuvent même provoquer la minéralisation des artères. D'ailleurs, plusieurs marqueurs du métabolisme osseux, dont la protéine de matrice α Gla, l'ostéocalcine, la BMP-2, la BMP-6, l'ostéopontine, l'osteonectine, l'OPG, le RANKL ainsi que des cytokines sont retrouvés dans les plaques athérosclérotiques (McFarlane et al., 2004). Par la suite, il peut y avoir rupture ou ulcération de la plaque d'athérome, embolie, thrombose et anévrisme (Ross, 1999).

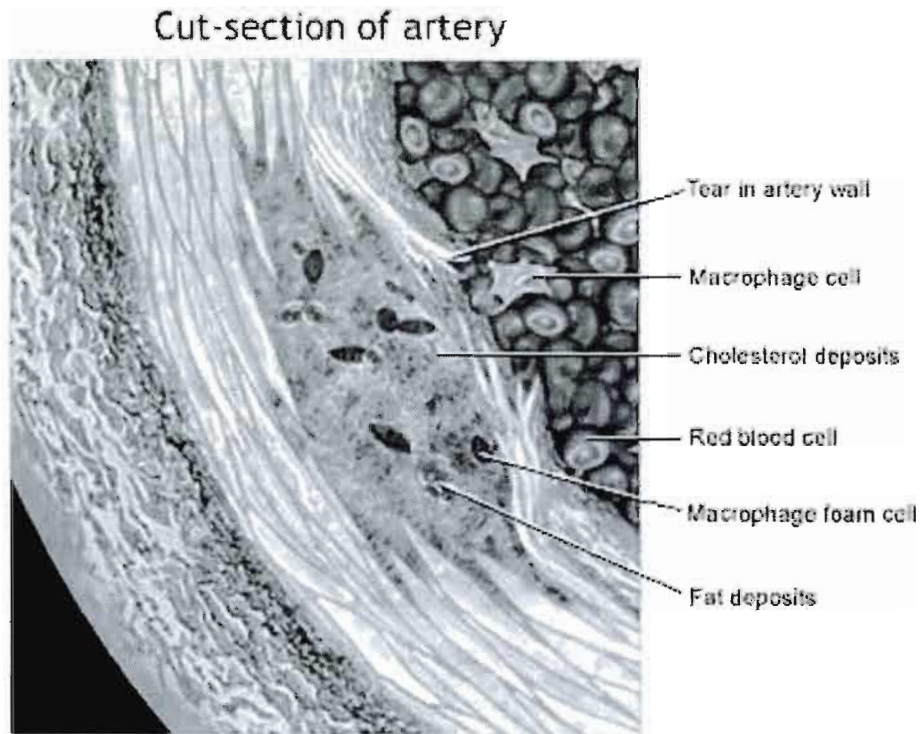


Fig. A8. Schéma d'une coupe transversale d'une artère avec une plaque athéromateuse.
La plaque comprend des macrophages, des cellules spumeuses et des dépôts de lipides provoquant l'obstruction partielle de la lumière du vaisseau.

1.5 : Les lipoprotéines

1.5.1. Structure moléculaire

Les lipides étant hydrophobes, ils requièrent un moyen de transport spécial afin d'être délivrés adéquatement, par la circulation, aux tissus. Les lipoprotéines sont des particules hydrophiles au cœur hydrophobe (figure A9). Elles sont composées d'une monocouche externe de phospholipides, de cholestérol libre et d'apolipoprotéines (apo). Elles transportent des molécules hydrophobes, tels des esters de cholestérol, des triglycérides et des vitamines lipophiles (Abate et al., 1995).

Les apolipoprotéines sont des constituants amphipatiques capables de lier les lipides des lipoprotéines. En plus de leur importance dans la structure des particules, leur rôle en tant que ligand de récepteurs leur permet de cibler aux tissus appropriés les composantes que les lipoprotéines transportent. De plus, elles fonctionnent comme co-facteurs enzymatiques permettant la transformation des lipides transportés. Par exemple, l'apoC-II stimule l'activité de la lipoprotéine lipase et l'apoA-I l'activité de la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT).

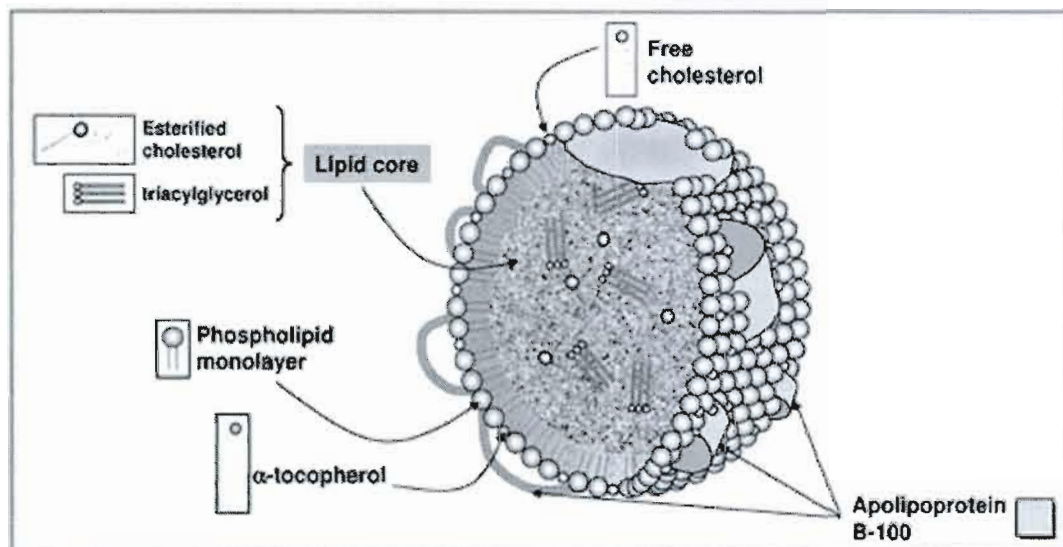


Fig. A9. Schéma tridimensionnel de la structure interne, membranaire et externe et des composantes moléculaires lipidiques et protéiques d'une particule de LDL.

1.5.2. Classification et métabolisme

1.5.2.1. Chylomicrons

Après le repas, les sucs pancréatiques hydrolysent les lipides complexes. La bile sécrétée dans le chyme permet l'émulsification et l'absorption des lipides (figure A10). Les entérocytes du jujénum forment des particules appelées chylomicrons à partir du cholestérol estérifié (50 % du cholestérol alimentaire) et des triglycérides alimentaires. Les chylomicrons portent l'apoB-48 initialement et servent au transport lipidique. Ils sont sécrétés dans la lymphe et rejoignent la circulation sanguine par l'intermédiaire du conduit thoracique pour une durée de quelques heures. Leurs triglycérides sont rapidement dégradés par la lipoprotéine lipase pour fournir les besoins métaboliques tissulaires. Les chylomicrons captent l'apoC et l'apoE des HDL. Les phospholipides hydrolysés s'associent à l'apoA-I pour former des HDL naissantes. Les restes de chylomicrons (*remnants*) entre en compétition avec les VLDL (*very low density lipoproteins*) pour leur captation par les récepteurs LRP (LDL *Receptor-related protein*) et les récepteurs à l'apoprotéine E et leur dégradation par le foie (70 %).

1.5.2.2. Lipoprotéines de très faible densité (*Very Low density lipoproteins*, VLDL)

À partir des particules lipidiques et protéiques fournies par les chylomicrons, le foie synthétise et sécrète les VLDL de grande taille par l'action de la protéine microsomale de transfert de triacylglycérol (MTP) (figure A10). Celles-ci sont formées de l'apoB-100 et servent à fournir des lipides aux tissus périphériques. Leur séjour sanguin est de courte durée à cause de la forte affinité des récepteurs à LDL (B/E) et de type *scavenger* de classe BI (SR-BI) pour l'apoB-100. L'activité de la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) permet l'enrichissement en esters de cholestérol des VLDL contre des triglycérides avec les HDL. Cette délipidation progressive conduit à la formation d'IDL (*Intermediate density lipoproteins*) puis en LDL engendré par l'action de la lipoprotéine lipase et de la lipase hépatique.

1.5.2.3. Lipoprotéines de faible densité (*Low density lipoproteins*, LDL)

La faible présence de l'apoE des LDL, particules enrichies en esters de cholestérols, confère une affinité plus faible envers les récepteurs à LDL, ce qui leur permet de subsister plus longtemps dans le sang (environ trois jours). Les LDL apportent le cholestérol aux tissus périphériques selon différents mécanismes de transfert lipidique. Les LDL *remnants* retournent au foie où elles seront captées et dégradées par endocytose (figure A10).

1.5.2.4. Lipoprotéines de haute densité (*High density lipoproteins*, HDL)

Le transport inverse du cholestérol des tissus périphériques vers le foie est effectué par les HDL (Tall, 1998). Celles-ci sont produites par le foie et ont, au moment d'entrer dans la circulation sanguine, une forme discoïdale, un très faible contenu lipidique et l'apo A-I. Le contact avec les transporteurs ABC (*ATP binding cassette*)-AI enclenche le captage du cholestérol cellulaire par les HDL. Ces transporteurs transfèrent unilatéralement le cholestérol cytoplasmique vers les HDL en utilisant l'énergie de l'ATP. L'enzyme sérique LCAT estérifie le cholestérol via le transfert d'un acide gras polyinsaturé sur le carbone 3, le rendant apolaire, ce qui accroît son accumulation dans les particules HDL. De taille croissante, celles-ci ont une action anti-athérosclérotique en rapportant le cholestérol vers le foie qui l'éliminera dans la bile (figure A10).

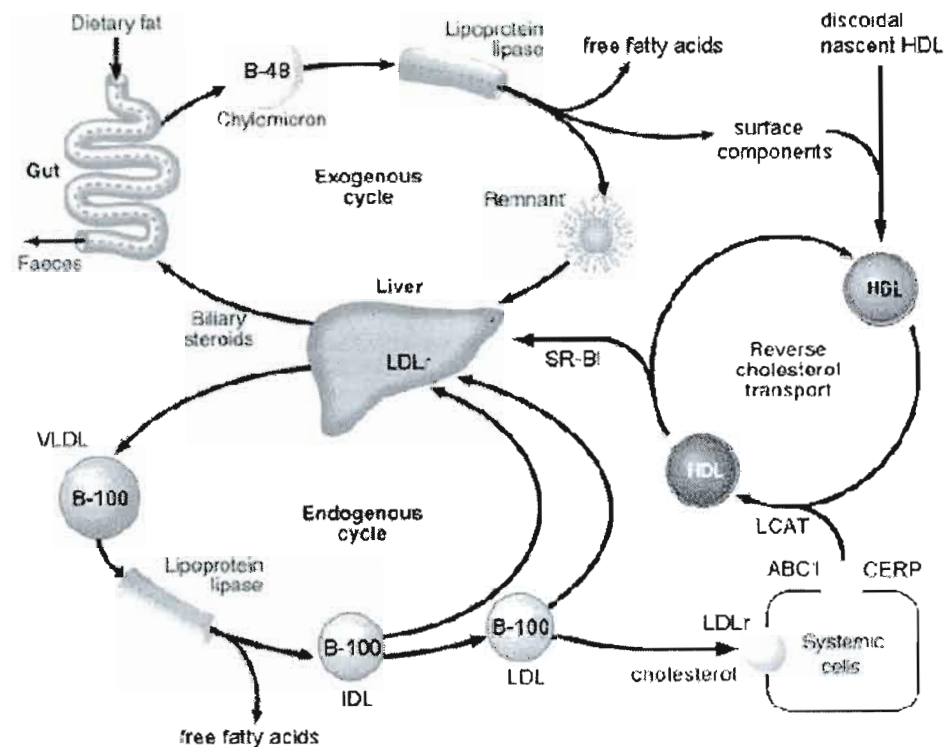


Fig. A10. **Schéma des composantes moléculaires impliquées dans le cycle métabolique du cholestérol.** Il y a d'abord l'absorption du cholestérol par l'intestin, la formation des chylomicrons, l'absorption par le foie, la sécrétion sanguine des VLDL, la transformation en IDL et LDL, le transfert aux tissus puis le transport inverse par les HDL.

1.5.3. Internalisation

La liaison des lipoprotéines aux récepteurs cellulaires engendre un changement de conformation qui enclenche différents types d'entrée des constituants. L'endocytose par récepteur interposé engendre l'entrée intracellulaire de différentes molécules/particules extracellulaires comme des facteurs de croissance, cytokines et lipoprotéines conjointement à leurs récepteurs (figure A11). L'endocytose des LDL est généralement réalisée par l'intermédiaire des récepteurs à LDL (récepteurs B/E) (Brown et Goldstein, 1976; Brown et Goldstein, 1986), des récepteurs à VLDL et des récepteurs SR-BI (Acton et al., 1994; Acton et al., 1996; Williams et al., 1999). Les récepteurs à LDL s'associent aux apoB ou apoE par

la région riche en acides aminés chargés des LDL, avec lesquels ils ont plus d'affinité qu'avec les oxLDL (Basu et al., 1978). Les LRP (récepteur apparenté aux récepteurs à LDL) présents dans le foie reconnaissent l'apoE, mais pas l'apoB-100. Ils interagissent ainsi avec les VLDL, et IDL et les chylomicrons *remnants*.

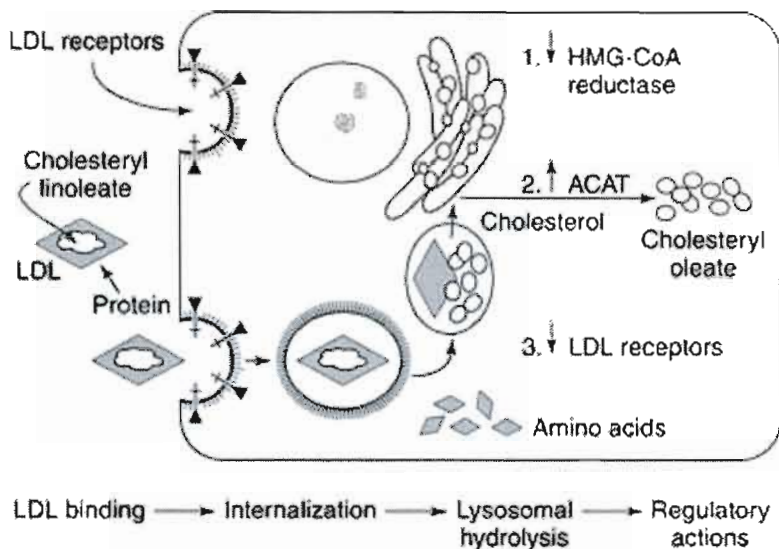


Fig. A11. Schéma du captage, de la dégradation et de la régulation enzymatique suivant l'internalisation cellulaire des particules de LDL.

Ce processus requiert l'auto-assemblage d'AP-2 (Assembly Protein 2). La protéine AP-2 fixe alors le complexe hexamérique de clathrine. La clathrine s'auto-polymérise et la formation d'une vésicule est catalysée par la liaison au GTP (guanosine triphosphate) qui permet la polymérisation de la dynamine (avec hydrolyse du GTP) (Schmid, 1997).

La vésicule forme un compartiment lisse appelé endosome précoce avec les protéines de fusion (SNARE). Le pH acide de celui-ci provoque la dissociation du récepteur au ligand, permettant son retour à la membrane dans un endosome de recyclage. L'endosome tardif ne contient plus que la particule de LDL et se dirige vers l'appareil de Golgi pour fusionner avec un lysosome. Le phagolysosome contient alors des enzymes hydrolytiques capables de

dégrader les apoprotéines, libérant le cholestérol pouvant ensuite s'intégrer aux membranes et moduler le métabolisme cellulaire (Mayorga et al., 1991).

Les cholestérols internalisés peuvent être directement utilisés pour le métabolisme cellulaire ou encore être estérifiés pour le stockage. Ils modifient l'état cellulaire en inhibant la HMG-CoA réductase (3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase) et la synthèse de récepteurs à LDL, mais activent l'acyl transférase (ACAT) servant à estérifier les cholestérols. Des mutations des récepteurs à LDL ou de l'apoB et/ou l'apoE sont responsables des hypercholestérolémies familiales. La plus fréquente concerne la mutation nommée apoB3500. Elle touche un occidental sur 500 et provoque des taux de LDL très élevés (Goldstein et al., 1995).

1.5.4. Récepteurs *scavengers*

Les LDL modifiés par oxydation ou acétylation se lient à différents membres de la famille des récepteurs *scavenger* (SR-AI, SR-AII, SR-BI, SR-BII, LOX-1, macrosialine/CD68 et CD36) (Endemann et al. 1993; Acton et al., 1994; Ramprasad et al. 1995; Freeman, 1997). Ils servent à nettoyer le sang de différentes particules ou même des bactéries (Brown et al., 1981; Brown et al., 1986). Les récepteurs *scavenger* SR-AI, SR-AII, LOX-1, SREC et CD36 sont particulièrement associés à l'interaction avec les oxLDL (Dhaliwal et Steinbrecher, 1999). Leur stimulation entraîne une transduction du signal menant à une réponse inflammatoire. L'affinité de SR-BI pour les lipoprotéines suit ce modèle : HDL > oxLDL > LDL > LDL acétylés (Fluiter et al., 1997). Le taux d'expression des récepteurs *scavengers* par les macrophages est peu influencé par la quantité de cholestérol cytoplasmique, ce qui peut mener à la formation de cellules spumeuses et au développement de l'athérosclérose (Steinberg 1989; Young).

Le récepteur LOX-1 (50 kDa) est reconnu pour interagir avec les oxLDL, stimulant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Il joue un rôle dans le développement de la pathologie de l'athérosclérose (Henriksen et al., 1982; Landar et al., 1996; Sawamura et al., 1997; Li et Mehta, 1999; Mingyi et al., 2002; Duerschmidt et al., 2006). Il est muni d'une section *leptin-like* extracellulaire riche en cystéine pouvant lier les oxLDL (Sawamura

et al., 1997; Xie et al., 2003) et d'une courte portion cytoplasmique. Il est exprimé par les cellules vasculaires coronariennes, les macrophages, le syncytiotrophoblaste et les cellules musculaires lisses (Duerschmidt et al., 2006; Steinbrecher, 1999). Leur reconnaissance des oxLDL est différente des autres récepteurs *scavenger*. L'activation du récepteur par les oxLDL se traduit par une production de ROS, une inhibition de l'activité de l'oxyde nitrique synthase (NOS) et l'activation de facteurs inflammatoires via NF- κ B (Duerschmidt et al., 2006). Sa stimulation mène à l'activation de l'endothélium (Landar et al., 1996; Li et Mehta, 1999) et à l'apoptose des cellules endothéliales vasculaires (CEV).

1.5.5. Oxydation des LDL

De hauts taux plasmatiques de lipoprotéines de faible densité (LDL) favorisent leur oxydation en oxLDL (Morel et al, 1984; Steinberg et al., 1989; Olkkonen et al., 2004). En relation avec l'athérosclérose, Morel et al. (1984) et Müller et al. (1998) accusent les cellules endothéliales (CEV) et du muscle lisse endothéliales (VSMC) de leur oxydation, tandis que d'autres études pointent vers les macrophages (Aviram et al 1994; Müller et al., 1999). La NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) oxydase, la 15-lipoxygénase, la myéloperoxydase et la chaîne de transport d'électrons mitochondriale sont parmi les systèmes enzymatiques contribuant à l'oxydation des LDL (Folcik et al. 1995). Leurs propriétés physicochimiques s'en trouvent transformées (Steinbrecher et al 1984). Premièrement, les lipides polyinsaturés subissent l'oxydation par différents agents (cigarette, macrophage, cellules endothéliales). L'oxydation se propage à d'autres lipides, aux cholestérols (oxystérols) et à l'apoB. Les constituants sont altérés et dégradés (Steinberg 1997). Les particules transportent des aldéhydes et des cétones (4-hydroxynonanal, malondialdéhyde (MDA)) provenant de l'oxydation des lipides polyinsaturés, pouvant créer des liens avec l'apoB. L'apoB se fragmente et se retrouve avec une augmentation de sa charge négative globale. Son épitope de reconnaissance aux récepteurs à LDL est altéré (Fong et al., 1987), tandis que son affinité pour les récepteurs *scavengers* est accrue (Young et McEneny, 2001). Elles ont un contenu réduit en esters de cholestérols.

Le cholestérol représente 33 à 36 % de la composition des LDL. Les oxystérols dérivent soit du métabolisme enzymatique du cholestérol, de l'alimentation ou encore de l'oxydation indirecte par d'autres facteurs (Olkkonen et al., 2004). Ils sont formés par l'ajout de groupements hydroxyles à différents endroits : 7 α -, 7 β -hydroxycholestérol, 7-kétocholestérol, 19-hydroxycholestérol, cholestérol-5 α ,6 α -époxyde, cholestérol-5 β ,6 β -époxyde, 22R-, 22S-, 25-, et 27-hydroxycholestérol. Tout comme les lipoprotéines, ces particules engendrent une panoplie d'effets selon leur concentration, le type cellulaire et l'espèce étudiée (Steinberg 1997; Vaya et al., 2001). Les oxystérols subissent la plupart des modifications normalement effectuées à la molécule de cholestérol, incluant l'estérification. En plus, ils peuvent lier des protéines cytoplasmiques et perturber la synthèse, l'estérification et l'efflux du cholestérol (Brown et Jessup, 1999).

La proportion des différents oxystérols contenus dans les lipoprotéines varie selon le temps d'incubation avec le cuivre, qui détermine le degré d'oxydation des particules. Une oxydation de 48 h forme de 15 à 20 % d'oxystérols par rapport au cholestérol total de la lipoprotéine. Rodriguez et al., (2004) a démontré par HPLC (chromatographie liquide à haute performance) que le 7ketocholestérol est l'oxystérol majoritaire suivi du 7 α -hydroxycholestérol et du 7 β -hydroxycholestérol (tous oxydés sur le carbone en position 7) après 24 h d'incubation des LDL avec le cuivre. La proportion du 7ketocholestérol augmente avec le temps d'oxydation, contrairement aux deux autres susceptibles d'être oxydés et convertis en 7ketocholestérol.

1.6 : Effets des oxLDL sur les cellules

1.6.1. Effets des particules

L'effet des oxLDL varie selon le type cellulaire, la concentration utilisée et leur degré d'oxydation (Negre-Salvayre et al., 1990; Subroto et Ghosh, 1996; Auge et al., 1995; Colles et al., 2001; Chen et al., 2007). Les oxLDL sont plus toxiques pour les cellules en division (Hessler et al., 1979; Kosugi et al., 1987). C'est la partie lipidique de la particule qui est responsable de l'effet nocif sur les fibroblastes, les CEV et les VSMC (Hessler et al., 1983).

Les LDL fortement (hox-LDL) et moyennement (mox-LDL) oxydées sont responsables du déclenchement de processus directement reliés au développement de l'athérosclérose. Ces particules stimulent l'expression par les CEV de molécules d'adhérence des monocytes (Steinberg et al., 1989; Takei et al., 2001; Berligner et al., 1995). Ainsi, après avoir favorisé le recrutement des monocytes, elles induisent leur différenciation en macrophages. De plus, ces particules activent la sécrétion de cytokines par les macrophages (Aviram et Rosenblat, 1994), tout en réduisant leur mobilité (Quinn et al. 1985). En plus, les oxLDL augmentent la perméabilité vasculaire endothéliale, favorisant le passage des monocytes sous l'endothélium vasculaire, permettant le contact avec les VSMC et la formation de la plaque athéromateuse (Claise et al., 1999). La formation de thrombus est un des risques associés à la pathologie de l'athérosclérose. En ce sens, les oxLDL provoquent une activation et une agrégation plaquettaires (Meraji et al., 1995; Weidtmann et al., 1995; Davi et Patrono, 2007; Korporaal et al., 2007).

Les oxLDL provoquent la prolifération de plusieurs modèles cellulaires. D'ailleurs, elles augmentent la synthèse de protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire, les cdk et les cyclines (Zettler et al., 2003) pour ensuite induire la division des fibroblastes (Zettler et al., 2003) et des VSMC via l'activation de la protéine kinase B (Auge et al., 1995; Subroto et Ghosh, 1996). En plus, la prolifération des VSMC (synthèse d'ADN) induite par de faibles concentrations de oxLDL (5 µg/ml) est inhibée par l'antioxydant N-acétylcystéine (NAC), ce qui démontre qu'elle est dépendante des ROS (Auge et al., 1995; Watanabe et al., 2001; Watanabe et al., 2002). Certaines études indiquent qu'elles augmentent la concentration intracellulaire d'ions calcium, ce qui enclenche la progression du cycle cellulaire des VSMC (Harris-Hooker et al., 1992). D'ailleurs, les oxLDL stimuleraient, davantage que les nLDL, la voie MAPK et la synthèse du facteur de croissance PDGF par les VSMC et les macrophages (Stiko-Rahm et al., 1992; Bjorkerud et Bjorkerud, 1996; Kusuhara et al., 1997). De plus, les cellules mésenchymateuses passent en phase S du cycle cellulaire en présence de faibles concentrations de oxLDL (0 à 50 µg/ml) (Dentelli et Rosso, 2007).

Les oxLDL sont connues pour être cytotoxiques, diminuer l'activité de réduction du sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) et induire l'apoptose des CEV à de faibles concentrations (40 µg/ml et plus de oxLDL) (Hessler et al 1983; Nègre-Salvayre et al., 1995; Kontush et al., 2003). L'incubation en présence de 200 µg/ml de oxLDL pendant 24 h induit la fragmentation de l'ADN et l'apoptose des CEV coronariennes et des cellules mésenchymateuses (Napoli et al., 2000; Dentelli et Rosso, 2007). De faibles concentrations de oxLDL ne changent pas la viabilité cellulaire des HUVEC, même en augmentant le temps d'incubation, tandis que 100 et 200 µg/ml induisent l'apoptose (Uemura et al., 2002). La viabilité des CEV cérébrales est réduite après 6 heures d'incubation avec 200 µg/ml de oxLDL (Chen et al., 2007). De plus, 100 µg/ml suffisent à réduire le nombre de CEV cérébrales après 24 h (Chen et al., 2007). Finalement, une incubation de 500 µg/ml de oxLDL pendant 24 h induit l'apoptose chez 55 % des monocytes THP-1 (Vicca et al., 2000). Ainsi, les oxLDL perturbent la viabilité, la survie et la prolifération cellulaire, ayant souvent comme aboutissement le déclenchement de l'apoptose à fortes concentrations ou avec l'augmentation du temps d'exposition.

1.6.2. Effets des composantes des particules

L'effet cytotoxique des oxLDL provient de la formation d'oxystérols. Selon Lemaire-Ewing et al. (2005), les oxystérols 7β-hydroxycholestérol, 7-ketocholestérol et cholestérol-5β,6β-époxyde sont les plus susceptibles d'être les responsables des effets cytotoxiques cellulaires. En effet, 25 µM de ces oxystérols provoque une réponse inflammatoire (sécrétion d'IL-6 et 11), la production du radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et l'apoptose de la lignée de cellules leucocytaires U937 (Lemaire-Ewing et al., 2005).

La cytotoxicité observée sur les cellules RPE (*human retinal pigment epithelium*) de concentrations croissantes de oxLDL (10 à 50 µg/ml) augmente dans le temps. À 24 h et 48 h, peu de perte de viabilité est observée, contrairement à 72 h où une diminution significative est obtenue avec 10 µg/ml. De plus, la cytotoxicité sur les RPE dépend de la formation et de la présence de 7ketocholestérol (Rodriguez et al., 2004). Ces cellules ont une perte de viabilité dès 24 h en présence de 50 µM de 7ketocholestérol. La co-incubation de 1 µg/ml de

nLDL avec des concentrations croissantes (10 à 100 μ M) de 7ketocholestérol et de 7 β -hydroxycholestérol provoque aussi une perte de viabilité des RPE dès les concentrations les plus faibles. D'ailleurs, 30 μ M de 7ketocholestérol induit la fragmentation de l'ADN et l'apoptose des VSMC après seulement 24 h d'incubation (Nishio et Watanabe, 1996). En plus, il a été démontré que 40 μ M de 7ketocholestérol induit l'expression de la NADPH oxydase 4 (NOX-4) dans les VMSC aortiques humaines. Il en résulte une production de ROS, qui est inhibée lors de l'utilisation d'un ARN interférant pour NOX-4 (Pedruzzi et al., 2004), et une induction de l'apoptose des VMSC dès 20 μ M (Lizard et al., 1997).

Le 7 β -hydroxycholestérol induit une perte de viabilité à partir de 24 h à 30 μ M, fortement accentuée après 48 h d'incubation avec les cellules U937. En plus, les cellules traitées ont une chute de leur contenu en glutathion (groupement SH) de 6 jusqu'à 24 h après l'incubation (Ryan et al., 2004). D'ailleurs le prétraitement de 24 h avec 100 μ M d' α -tocophérol, un agent antioxydant, prévient l'apoptose et la génération de ROS des VSMC en présence de 50 μ M de 7ketocholestérol et de 7 β -hydroxycholestérol (Uemura et al., 2002).

La lysoPC est un phospholipide modifié produit à partir de la phosphatidylcholine via l'action de la phospholipase A2 ou suite à l'oxydation par les ROS (Wu et al., 1998). Elle est transportée par les oxLDL (Wu et al., 1998). Elle est reconnue pour son action cytotoxique sur plusieurs modèles cellulaires, dont les cellules endothéliales. Elle serait même responsable de certains effets athérosclérotiques observés en présence de oxLDL. En effet, elle induit l'agrégation des plaquettes (Siess et al., 1999) et la prolifération des VSMC via l'activation des MAPK et de AP-1 et l'élévation du calcium intracellulaire (Yamakawa et al., 1998). De plus, la stimulation de la synthèse d'ADN induite par les oxLDL serait dépendante de la lysoPC (Heinloth et al., 2000). Elle a aussi démontrée pouvoir augmenter la production de ROS dans les HUVEC via l'activation de la NADPH oxydase (Heinloth et al., 2000) et dans les CEV aortiques bovines parallèlement à la synthèse d'une sous-unité de la NADPH oxydase (Takeshita et al., 2000). Elle est aussi un des agents des LDL responsable du déclenchement de l'apoptose (clivage de la caspase-3, fragmentation de l'ADN et perte d'activité MTT) des CEV humaines (Kontush et al., 2003; Huang et al., 2005).

1.7 : Rôles des oxLDL dans le développement de l'ostéoporose

En plus des études épidémiologiques indiquant que le fait d'être atteint d'athérosclérose suffit à accroître les risques de développer l'ostéoporose, il existe, dans la littérature, des évidences de la perturbation du métabolisme cellulaire osseux par les oxLDL ou leurs composantes. Les études de Parhami ont indiqué pour la première fois que les oxLDL inhibent la différenciation ostéoblastique des cellules souches de la moelle osseuse mesurée par l'activité de la phosphatase alcaline et la sécrétion de collagène (Parhami et al., 1999). De plus, en présence des oxLDL, les cellules progénitrices de la moelle se différencieraient préférentiellement en adipocytes plutôt qu'en ostéoblastes, et les oxLDL favoriseraient la calcification vasculaire en augmentant l'activité de la phosphatase alcaline des cellules vasculaires (Parhami et al., 1997). Liu et al. (2005) ont démontré que l'oxystérol cholestane-3beta,5alpha,6beta-triol provoque l'apoptose et inhibe la différenciation ostéoblastique de cellules de la moelle osseuse de rat. Finalement, le potentiel antioxydant des femmes ostéoporotiques, mesuré par l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et de la glutathion peroxydase (GSX) et par les taux plasmatiques de vitamine C, E et A, est significativement plus bas que chez les sujets avec une BMD normale (Maggio et al., 2003). Ainsi, l'oxydo-réduction plasmatique serait un indicateur du risque ostéoporotique. Ces résultats démontrent l'interaction des cellules ostéoblastiques avec les oxLDL, attribuant un effet potentiel des particules dans le risque de souffrir d'ostéoporose.

1.8 : Oxydoréduction cellulaire

Les organismes aérobiques ont dû développer des systèmes permettant de maintenir un état cytoplasmique réduit tout en vivant dans un milieu à forte concentration en oxygène (21 %) (Ghezzi, 2005). Ils utilisent l'oxygène comme accepteur final d'électron dans le processus respiratoire moléculaire. L'imperfection du système génère des espèces intermédiaires réactives, appelées espèces réactives de l'oxygène (ROS), incluant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et $O_2^{\cdot-}$. Ceux-ci ont le potentiel de réagir et d'endommager plusieurs constituants cellulaires tels les lipides, les protéines ou même les acides nucléiques (Ghezzi, 2005). Elles ont une tendance particulière à réagir avec les protéines contenant l'acide aminé cystéine

(Jones et al., 2004). Ces groupements sont sensibles à la formation de ponts disulfure modifiant la structure fonctionnelle de certaines protéines. Les systèmes régulant l'état d'oxydoréduction cellulaire font partie de la superfamille thiorédoxine. Ils sont impliqués dans la neutralisation des ROS et la régénération sous leur forme réduite des groupements thiols (SH-) des protéines (Holmgren, 1989). Entre autre, le système glutarédoxine est généré par la réduction de la glutarédoxine par le tripeptide glutathion réduit (GSH). Le GSH est synthétisé grâce à l'action de la glutamate cystéine ligase qui lie la L-cystéine et le L-glutamate en utilisant l'ATP, puis de la glutathion synthétase qui ajoute au groupement la glycine. La reformation de GSH à partir du glutathion oxydé (GSSG) est catalysée par la glutathion réductase et le co-facteur NADPH (figure A10). Le N-acétylcystéine (NAC) est un antioxydant largement utilisé pouvant aussi régénérer les stocks de GSH. Une forte exposition aux ROS mène à la surcharge des mécanismes de régénération des groupements thiols, ce qui expose la cellule et ses constituants à des dommages.

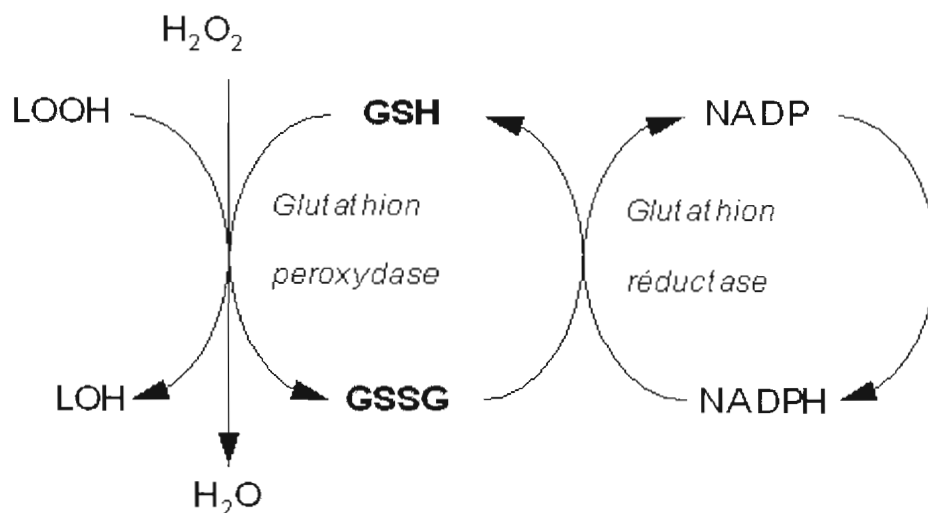


Fig. A12. Régénération du glutathion, par l'utilisation du facteur réducteur NADPH, pouvant neutraliser et transformer le peroxyde d'hydrogène en eau.

1.9 : Hypothèses et objectifs

1.9.1. Hypothèses

Étant donné que la littérature concernant les oxLDL est composée d'un éventail d'effets allant de la stimulation de la viabilité et de la prolifération à la mort cellulaire en fonction des concentrations utilisées et du temps d'incubation, nous proposons qu'une exposition à des concentrations croissantes de oxLDL sur les ostéoblastes ne produira pas une réponse monophasique. Nous croyons que la viabilité cellulaire ostéoblastique variera, allant de la stimulation à l'inhibition, en fonction des concentrations et du degré d'oxydation des LDL.

En toxicologie, l'hormèse est un phénomène caractérisé par une courbe dose-réponse biphasique. L'exposition à un agent toxique à faibles doses peut stimuler ou exciter un organisme (Calabrese, 2002; Calabrese, 2005). De façon analogue, une stimulation de la prolifération en présence de faibles concentrations de oxLDL a été rapportée, tandis que l'apoptose est déclenchée à fortes concentrations chez différents modèles cellulaires.

En se basant sur les précédents retrouvés avec d'autres modèles ou systèmes dans la littérature, nous avons émis comme première l'hypothèse que l'exposition des ostéoblastes aux oxLDL permettra de retrouver le profil type de l'hormèse lors d'essais d'activité MTT.

Notre deuxième hypothèse était que la variation de l'activité MTT en présence de oxLDL serait proportionnelle au nombre de cellules, à la masse mitochondriale et à la taille cellulaire.

Étant donné que les essais MTT mesurent spécifiquement le potentiel réducteur cellulaire et dans l'éventualité d'une absence de corrélation entre l'activité MTT et le nombre de cellules, nous nous proposons de déterminer la nature de la stimulation à faibles concentrations. Notre troisième hypothèse était que les oxLDL induiraient une production de ROS intracellulaire pouvant stimuler des mécanismes de défense impliqués dans la génération ou l'utilisation de

facteurs réducteurs, tel le NAD(P)H. Ceux-ci sont susceptibles d'être impliqués dans la réduction du MTT.

La proposition d'une réponse hormésique implique que la stimulation est perdue avec de plus fortes concentrations de oxLDL. Ainsi nous voulions évaluer l'impact de la stimulation à faibles concentrations de oxLDL sur les fonctions cellulaires. Nous avons émis comme quatrième hypothèse que l'effet de stimulation obtenu à faibles concentrations ne représentait pas une augmentation réelle de la viabilité, mais traduisait une réponse à un stress oxydatif pouvant altérer les fonctions des ostéoblastes.

1.9.2. Objectifs

Notre premier objectif était de caractériser l'effet des oxLDL, des oxystérols 7 β -hydroxycholestérol et 7ketocholestérol et de la lysoPC sur l'activité MTT, ainsi que sur la prolifération et la viabilité des ostéoblastes humains MG-63.

Notre deuxième objectif était de vérifier si l'activité MTT des cellules MG-63 en présence de concentrations croissantes de oxLDL et de 7 β -hydroxycholestérol est en lien avec la stimulation de la prolifération ou la cytotoxicité.

Notre troisième objectif était, dans le cas où la prolifération cellulaire ne représente pas une corrélation positive directe avec l'augmentation de l'activité MTT, de caractériser la nature et l'origine de la portion correspondant à la stimulation de l'activité MTT par les oxLDL.

Notre quatrième objectif était d'évaluer l'impact de faibles concentrations de oxLDL sur les fonctions des cellules ostéoblastiques. Est-ce que l'augmentation de l'activité MTT ou de la prolifération se traduit par un effet bénéfique physiologiquement?

1.9.3. Modèles cellulaires utilisés

La lignée MG-63 a été privilégiée pour l'ensemble des expérimentations considérant son taux de division rapide et son phénotype ostéoblastique. Elle provient d'un ostéosarcome d'un homme de 14 ans. Sa morphologie est similaire aux fibroblastes. Elle synthétise le collagène IAI et a une activité phosphatase alcaline. De plus, elle exprime l'homéoprotéine Mx2 ainsi

que le facteur de transcription *cbfa1* impliqués dans la différenciation ostéoblastique (Ducy et al., 1997; Hattar et al., 2002).

Étant donné les différences génotypiques et phénotypiques entre les différents modèles de pré-ostéoblastes humains (cellules MG-63, SaOS et U2OS), et avec des ostéoblastes en culture primaire (cellules de la moelle osseuse de souris C57BL/6), il est intéressant de comparer les différentes réponses de ces cellules à la présence de oxLDL.

Les cellules SaOS proviennent d'un ostéosarcome à faible pouvoir invasif d'une femme caucasienne de 11 ans. Elles sont les plus matures ostéoblastiquement et adoptent la morphologie des cellules épithéliales (Hattar et al. 2002). Cette lignée exprime la phosphatase alcaline, l'OPG, *cbfa1*, de faibles niveaux d'ostéopontine, de collagène IAl et l'ostéocalcine (Dass et al., 2006; Fogh et al., 1977). Enfin, elles sont aptes à former des nodules de minéralisation.

Les cellules U2OS sont négatives pour la plupart des marqueurs ostéoblastiques. Elles ont une morphologie épithéliale et proviennent du tibia d'une femme de 14 ans. Elles expriment p53, l'OPG, *cbfa1/Runx2*, une faible activité de la phosphatase alcaline et peu d'ostéopontine (Fogh et al., 1977). Enfin, elles sont aptes à former des nodules de minéralisation (Dass et al., 2006).

Des cultures primaires d'ostéoblastes de souris C57BL/6 permettront de confirmer la véracité et la réalité physiologique des résultats obtenus avec les autres lignées.

CHAPITRE II

RÉSULTATS

2.1. : Contribution et étapes

Au cours de ma maîtrise, j'ai rédigé un article intitulé *Characterization of oxidized low density lipoproteins-induced hormesis-like effects in osteoblastic cells* (Caractérisation de l'effet de type hormésique induit par les lipoprotéines de faibles densité oxydées sur des cellules ostéoblastiques). Je suis premier auteur de l'article avec Élie Abed, Louise Brissette et Robert Moreau qui figurent dans la liste d'auteurs. Elie Abed a effectué les expériences portant sur la migration cellulaire.

L'article regroupe les résultats que j'ai obtenus durant ma formation et porte sur l'analyse de l'effet paradoxal, en présence de faibles concentrations de lipoprotéines de faible densité oxydées, de stimulation du métabolisme des cellules pré-ostéoblastiques humaines MG-63. L'augmentation d'activité cellulaire mesurée par la réduction du sel de tétrazolium en formazan est perdue avec le temps et à plus forte concentration. L'investigation sur les origines de cette stimulation forme le cœur de l'article. En effet, l'état d'homéostasie intracellulaire est évalué, entre autres, par le contenu en NAD(P)H, le statut mitochondrial et la production d'espèces réactives de l'oxygène.

L'article a été récemment accepté pour publication dans la revue *The American Journal of Physiology - Cell Physiology*. Les éditeurs de cette revue sont à la recherche d'articles reliant la biochimie, la biologie, la physique et la pharmacologie. Ils sont ouverts aux articles novateurs proposant des mécanismes normaux ou anormaux de fonctionnement cellulaire. Les recherches originales portant sur le fonctionnement des organites, la respiration mitochondriale, le trafic ionique, protéique ou par endocytose, l'effet d'agents toxiques, l'apoptose ou la différenciation sont encouragées. Cette revue œuvre ainsi en joignant des connaissances de disciplines connexes et présente un facteur d'impact de 4.334 en 2006.

Nos orientations de recherche cadrent dans les critères de la revue. Avec l'accord de mon directeur de recherche Robert Moreau, je souhaite présenter mon mémoire par article (article accepté par la revue *The American Journal of Physiology - Cell Physiology*).

2.2. : Article publié

Characterization of oxidized low density lipoproteins-induced hormesis-like effects in osteoblastic cells

Hamel P.¹, Abed E.¹, Brissette L.², Moreau R.^{1*}

¹Laboratoire du métabolisme osseux

²Laboratoire du métabolisme des lipoprotéines

Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada
H3C 3P8

American Journal Of Physiology, Cell Physiology

2.2.1. Abstract

Epidemiological studies indicate that patients suffering from atherosclerosis are predisposed to develop osteoporosis. Atherogenic determinants such as oxidized low density lipoprotein (oxLDL) particles have been shown both to stimulate the proliferation and promote apoptosis of bone-forming osteoblasts. Given such opposite responses, we characterized the oxLDL-induced hormesis-like effects in osteoblasts. Biphasic MTT reductive activity responses were induced by oxLDL where low concentrations (10-50 microg/ml) increased and high concentrations (from 150 microg/ml) reduced the MTT activity. Stimulation of cell proliferation by oxLDL partially accounted for the increased MTT activity. The oxLDL-induced increased MTT activity was not associated with enhanced endosomal/lysosomal activity. No alteration of mitochondria mass was noticed whereas low concentrations of oxLDL induced mitochondria hyperpolarization and increased the levels of reactive oxygen species (ROS). The increased MTT activity induced by oxLDL was not related to intracellular ROS levels. OxLDL increased NAD(P)H-associated cellular fluorescence and flavoenzyme inhibitor DPI reduced basal and oxLDL-induced MTT activity in a dose-dependent manner, suggesting an enhancement of NAD(P)H-dependent cell reductive potential. Low concentrations of oxLDL reduced cellular thiol content and induced an increase of metallothionein expression suggesting the induction of compensatory mechanism for the maintenance of cell redox state. Nevertheless, these concentrations of oxLDL reduced alkaline phosphatase activity and cell migration of osteoblastic cells. Our results indicate that oxLDL particles cause hormesis-like response which are associated with the stimulation by low concentrations of oxLDL of both proliferation and cellular NAD(P)H-dependent reduction potential, while high concentrations lead to reduction of MTT activity associated with cell death. Given the effects of low concentrations of oxLDL on osteoblast alkaline phosphatase activity and migration, oxLDL may contribute to the impairment of bone remodeling equilibrium.

Keywords: **osteoblasts; atherosclerosis; oxLDL; oxysterol; hormesis**

2.2.2. Introduction

Elevated levels of serum low-density lipoprotein (LDL) particles are considered as the most important atherogenic risk factor. LDL particles are thought to become atherogenic after undergoing oxidative modifications and key roles of oxidized LDL (various oxidized species collectively designated oxLDL) in atherosclerosis have been largely reviewed by Steinberg (46). Oxidized LDL and oxysterols have been shown to increase or decrease proliferation, and trigger apoptosis process depending on the cell types related to vasculature alterations, nature of oxLDL and oxysterols, and on the concentrations used (52); thus supporting numerous deleterious effects that sustain the development of atherosclerosis. Also, a number of clinical studies suggest an association between cardiovascular diseases and the development of osteoporosis, independently of age and hormonal deficiency (2, 3, 48-50). Positive relationships with LDL particles and LDL-associated apoB both in men and women have been reported for osteoporosis (1, 37, 41). Lipid accumulation has been observed in osteoporotic and aging bone (36, 42, 47). The presence of oxidized lipids was revealed in the bone marrow of hyperlipidemic mice (47). Furthermore Maggio et al (33) have reported a marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women. Therefore, these studies suggest the existence of one or several contributory factors for the parallel development of atherosclerosis and osteoporosis.

The bone is a dynamic tissue that is continuously being remodelled following two opposite and coordinated processes. Under normal conditions, specialized cells called osteoclasts transiently break down old bone (resorption process) at multiple sites as other cells known as osteoblasts are replacing it with new tissue (bone formation). Following differentiation from mesenchymal stem cells, osteoblastic cells assure bone formation and mineralization through the secretion of bone matrix components (type I collagen and noncollagenous proteins), and also play a central role in the regulation of bone resorption by providing essential factors such as macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) and

receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) for the differentiation of osteoclasts (32). In this context, alteration of osteoblastic proliferation, differentiation, secretory functions or apoptosis rate are thought to compromise the maintenance of bone remodelling equilibrium. Parhami et al. (40) reported a reduction of bone mineralization in mice fed with an atherogenic high-fat diet, with a decreased expression of osteoblastic marker osteocalcin by marrow cells suggesting an inhibition of osteoblastic differentiation. Accordingly oxLDL particles have been reported to promote *in vitro* cell proliferation and to inhibit the differentiation of murine osteoprogenitor cell line MC3T3-E1 and of bone marrow osteoblastic precursor cells (38, 39). Liu et al. (29) showed that low concentrations of oxysterol cholestane-3b,5a,6b-triol increased cell viability and that high concentrations inhibited osteoblastic differentiation and promoted the apoptosis of primary rat bone marrow stromal cells. Klein et al (20) reported an inhibition of the osteoblastic phenotype marker alkaline phosphatase activity and cell death by oxLDL in human osteoblastic SaOS cells. We have reported that high concentrations of oxLDL cause cell death through the apoptosis of human osteoblastic MG-63 cells (6). Altogether, the studies have reported paradoxical stimulation and loss of osteoblastic viability by oxLDL which have highlighted oxLDL as a contributory factor for the parallel development of atherosclerosis and osteoporosis.

Given that the effects of oxLDL appear to be dependent on the concentrations, we speculated that the effects of oxLDL on cell viability may not correspond to typical monophasic dose-response but rather be associated with biphasic responses related to hormesis. Determination of dose-response effects is general procedure in toxicology for the risk evaluation and the establishment of exposure guidelines in view of monophasic responses. The MTT assay has been widely used for this end and has also permitted to reveal in some cases biphasic hormesis responses (13, 14, 43, 51). Hormesis has been defined as a dose-response relationship in which a stimulatory response occurs at low doses, and an inhibitory response takes place at high doses, resulting in a U- or inverted U-shaped dose response (10). Biphasic relationships have been described for various end point functions such as growth (metabolism, proliferation, survival, longevity) and deleterious effects (disease, cancer, etc). Hormesis

is considered as an evolutionarily conserved process and the mechanisms underlying hormesis remain an enigma. The induction of biphasic hormesis-like relationships have been described for mild heat stress, radiation and by exposure to environmental toxic agents such as heavy metals (11). In some cases, hormesis has been considered as an adaptive or conditioning response that increases the resistance of the cell or organism from moderate to severe levels of stress. Such observations of biphasic dose-response relationships have changed the general conception of the risk evaluation since the stimulation effect of low concentrations may result in the loss of regulation and equilibrium of cell functions, especially in view of bone remodeling

Given that opposite effects by oxLDL such as stimulation of cell viability and promotion of cell death have been reported in osteoblastic cells, we have characterized the hormesis-like effects induced by oxLDL in osteoblastic cells and focused on the effects of low concentrations of oxLDL on osteoblastic functions.

2.2.3. Materials and methods

Cell culture

Human osteoblastic MG-63, SaOS, U2 OS, and murine osteoprogenitor MC3T3 cells (ATCC, Rockville, MD, USA) were grown in a 1:1 mixture of phenol-free DMEM/Ham's F12 medium (DMEM/F12; Sigma, Oakville, Ontario, Canada) for MG-63, in McCoy's medium (Hyclone, Logan, UT, USA) for SaOS and U2 OS cells, and in alpha-MEM medium (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) for MC3T3 cells. All media were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Cansera, Etobicoke, Ontario, Canada), L-glutamine (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) and penicillin/streptomycin (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). Cells were cultured in 5% CO₂ at 37 °C and were harvested weekly with Trypsin-EDTA solution (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). Bone marrow stromal cells (BMSC) and primary osteoblasts (mOB) from C57BL/6 mice were isolated as described previously (12, 23). Briefly, mice were euthanased according to institution procedure and the femur and tibia were removed under aseptic conditions. Bones were broken in half and centrifuged for the collection of BMSC. Following a short spin, the cell pellets were re-suspended, seeded in 100 mm dishes (Sarstedt, Montréal, Québec, Canada), and allowed to adhere for two days in alpha-MEM medium (osteoblastic differentiation medium) supplemented with 15% FBS. The cells remaining in suspensions were washed out and adherent cells were cultured for one to two weeks. For mOB, bone fragments were subjected to three consecutive digestions with collagenase A (Sigma) and digested-fragments were plated with alpha-MEM medium in 100mm dishes (Sarstedt) until cells outgrowth and reach confluence.

Isolation and modification of lipoproteins

Lipoprotein particles were isolated from human plasma obtained from Bioreclamation (Hicksville, NY, USA). Prior to the isolation, the plasma was adjusted to 0.01% ethylenediamine tetraacetate (EDTA), 0.02% sodium azide and 10 µM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF). Human LDL ($d = 1.025-1.063$

g/ml) were prepared as described by Brisette *et al.* (5). Lipoprotein particles contained no detectable amount of apoE as assessed by immunoblotting.

LDL preparations were dialysed against Tris-buffered saline (TBS) to remove EDTA before oxidation. Oxidized LDL particles were prepared as described by Lougheed and Steinbrecher (31). LDL particles (200 µg of protein/ml in TBS) were incubated with 5 µM CuSO₄ for 20h at 37°C. Oxidation was stopped by the addition of EDTA (final concentration of 100 µM) and butylated hydroxytoluene (40 µM final) and the oxLDL particles were concentrated to 15-20 mg/ml using Centriplus-100 ultrafiltration devices (Amicon, Oakville, Ont.). Oxidized LDL typically resulted in a 2.8-fold increase in the electrophoretic mobility relative to native LDL on 0.5 % agarose/barbital gels.

MTT reduction assay

For measurement of cell proliferation or viability, cells were seeded in 96-well plates (Sarstedt). After 5 days of culture in media containing 10% FBS, the cells were further incubated in DMEM/F12 without FBS in the absence or the presence of native LDL, oxidized LDL or oxysterols 7-ketocholesterol and 7β-hydroxycholesterol (Sigma, Oakville, Ontario, Canada). Two hours prior to the end of treatments, the media was replaced with DMEM/F12 containing 0.5 mg/ml of MTT (Sigma, Oakville, Ontario, Canada). Cellular reduction of the tetrazolium ring of MTT resulted in the formation of a dark purple water insoluble deposit, the formazan crystals. At the end of the incubation, media was aspirated and formazan crystals were dissolved in DMSO. Absorbance was measured at 575 nm with a spectrophotometer and data was expressed as relative MTT activity corresponding to the ratio of absorbance of lipoprotein-treated cells vs control cells incubated with DMEM/F12 alone. In certain experiments, the cells were pretreated with chloroquine or diphenyleneiodonium (DPI) 1h prior to the addition of MTT or 24h with the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) or L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO), an inhibitor of gamma-glutamylcysteine synthetase, prior to treatment with oxLDL. Chloroquine diffuses into acidic compartments and becomes protonated, thereby destroying the acidic environment and inactivating the acid-dependent lysosomal enzymes. DPI phenylates and

inhibits a variety of flavoenzymes, such as the mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I) and the NADPH oxidase.

Flow cytometry and confocal microscopy analysis

For cell division analysis, CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester (CFSE, Invitrogen) was used. This cell permeable dye is de-esterified by intracellular enzymes creating a charged molecule trapped inside the cells. Upon division, daughter cells get half of the fluorescent marker and therefore reduction of fluorescence may be used to monitor cell division. CFSE (5 mM stock solution in DMSO) was added (final concentration of 2 μ M) to the cells for 10 min at 37 °C. Labeling was stopped by the addition of 10% FBS for 15 min. CFSE labeled cells were cultured in vitro under different conditions. Cells were therefore trypsinized and analysed by flow cytometry with logarithmic detection of green fluorescence (CFSE). For cell counts, internal calibrator microspheres were added immediately prior to flow cytometric analysis. Using the cytofluorometer forward scatter and side scatter parameters, the interference of apoptotic cells and debris was excluded. Cell size was determined by the Forward side scatter function (SSC). Data were acquired in a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) using the Cell Quest software.

For the determination of mitochondria mass, the cells were incubated with 200 nM MitoTracker Green FM (Invitrogen) in DMEM/F12 for 30 minutes at 37°C, washed twice, and then analysed by a FACScan flow cytometer. This dye accumulates in the mitochondria regardless of the membrane potential which allows the quantification of the amount of mitochondria. The mitochondrial membrane potential of intact cells was measured by flow cytometry with the lipophilic cationic probe 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1; Invitrogen). According to the mitochondrial potential, monomeric forms of JC-1 emit green fluorescence upon depolarization whereas their aggregation leads to red fluorescent with the hyperpolarization of mitochondria. Hence, the red/green fluorescent ratio is a way to measure the polarization, or potential energy of the mitochondria. Following treatments, the cells were trypsinized and the cell pellets were resuspended in

500 μ l of PBS, incubated with 10 μ M JC-1 for 20 min at 37°C. The cells were subsequently washed once with cold PBS, suspended in a total volume of 350 μ l and analyzed by flow cytometer. The production of intracellular ROS was measured with the fluorescent dye carboxy-methyl dichlorofluorescein diacetate (CM-H₂DCF-DA) (Invitrogen). This probe is non-fluorescent until cleavage by intracellular esterases, and its oxidation by intracellular ROS increases the fluorescence. Cells were incubated in culture media with CM-H₂DCF-DA for 1h at a final concentration of 10 μ M. Thereafter, cells were incubated at 37°C for various periods of time with oxLDL, washed with PBS, harvested and analyzed immediately by flow cytometry. For cellular autofluorescence measurements, treated cells were harvested and analyzed immediately by flow cytometry (λ_{exc} at 488 nm and λ_{em} at 530 and 570 nm).

For lysosomal staining, MG-63 cells were vitally stained with an acridine orange (AO, Sigma) solution at 5 μ g/ml in complete medium for 30 minutes at 37°C. AO is a lysosomotropic weak base and a metachromatic fluorochrome showing at high concentrations red fluorescence and green fluorescence at low concentrations. The intensities of red and green AO fluorescence were then examined with a laser scanning confocal (Bio-Rad) microscope (Nikon TE300) using a Plan-Apochromatic 60X oil N.A. 1.4 objective lens. For NAD(P)H-associated cellular fluorescence, the analysis was performed with CCD camera (λ_{exc} at 360 nm and λ_{em} at 460). For the measurements of cellular thiol content, cells were incubated in the culture medium or in the presence of oxLDL for 24 h. Thereafter, the cells were loaded with CMFDA for 30 min and the fluorescence was examined with a laser scanning confocal microscope, and analyzed with ImageJ software.

Metallothionein expression

Total RNA from cells was extracted using TriZol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription (RT) reactions were carried out with Omniscript RT kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) using hexamers. PCR amplifications were conducted with *Taq* PCR core kit (Qiagen) using specific primer sets for human metallothionein 1 and 2 (sense, 5'-

TGGACCCCAACTGCTCCTGC-3'; antisense, 5'-GCCCTGGGCACACTTGGCAC-3') and for human GAPDH (sense, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'; antisense, 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'). Each primer was designed in distinct exons to ensure specific transcript amplification. Briefly, amplifications were carried out for 40 cycles according to incubation of 1 min at 94 °C, 30 s at 58 °C and 1 min at 72 °C. Amplification products were resolved in 2% agarose gel and revealed by ethidium bromide staining.

Cell migration

In order to investigate the effects of oxLDL on MG-63 cell migration, a wound scratch assay was performed. Briefly, the cells were grown to confluent monolayer on 35mm diameter dishes (Sarstedt). The monolayers were wounded by scratching the surface as uniformly as possible with a pipette tip. This initial wounding and the movement of the cells in the scratched area was photographically monitored using the Axiovert Zeiss 200 microscope with a 10× (NA0.25) objective linked to a Coolsnap Es CCD camera for 24 hr. This time interval has been chosen because it is shorter than MG-63 doubling time in these conditions. Four different fields from each sample were considered for quantitative estimation of the number of cells that have migrated to the wounded area using imageJ software. The values are expressed as the relative cell migration compared to control condition in the culture medium.

Alkaline phosphatase activity

Measurement of alkaline phosphatase activity was performed by colorimetric assay of enzyme activity as described previously (35). Cell monolayers were washed three times with PBS buffer (0.1 g/l CaCl₂, 0.2 g/l KCl, 0.2 g/l KH₂PO₄, 0.1 g/l MgCl₂·6H₂O, 8 g/l NaCl, 1.44 g/l Na₂HPO₄, pH 7.4) and then scraped into assay buffer (100 mM glycine, 1mM MgCl₂, 1mM ZnCl₂, 1% Triton X-100, pH 10.5). Assays were performed in 96-well plates with 75 µl of lysate mixed with 75 µl of the freshly prepared colorimetric substrate *para*-nitrophenyl phosphate (12 mM; Sigma, Oakville, Ontario, Canada) solubilized in the assay buffer. The enzymatic reaction was conducted for 1 h at 37 °C and was stopped

by adding 100 μ l of NaOH 0.2N. The optical density of the yellow product *para*-nitrophenol was determined spectrophotometrically at 410 nm. Alkaline phosphatase activity was expressed as *para*-nitrophenol produced in nmol/1h/mg of protein.

Cellular protein quantification

Cellular protein contents were quantified by MicroBCA protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA) using BSA as standard.

Statistical analysis

Statistical differences were analysed by an ANOVA or Student t test using the GraphPad Prism3. A level of $P < 0.05$ was considered as significant.

2.2.4. Results

Effects of oxidized LDL on the MTT activity of MG-63 cells.

The levels of circulating oxLDL have been mentioned as a predictive and sensitive marker of coronary artery diseases. Holvoet et al. (17-19) have reported circulating concentrations of oxLDL ranging from 6-14 $\mu\text{g/ml}$ for the patients showing no risk equivalent for coronary artery disease to 13-75 $\mu\text{g/ml}$ for the patients with prevalence of coronary artery disease. In order to investigate both stimulation and inhibition responses corresponding to hormesis and reveal the effects of oxLDL at concentrations physiologically relevant, we evaluated the effects of oxLDL by monitoring the MTT activity of osteoblastic cells exposed to concentrations ranging from 10 to 250 $\mu\text{g/ml}$. The MTT activity was determined in various models of human osteoblastic cells (MG-63, SaOS and U2 OS), murine osteoblastic MC3T3 cells, primary cultures of murine bone marrow stromal cells (BMSC) and osteoblasts from long bones (mOB) incubated with increasing concentrations of oxLDL. As shown in the Fig. 1A, oxLDL increased or decreased the MTT activity by osteoblastic cells after 48h of incubation according to the concentrations used (ANOVA, $P < 0.0001$). At low concentrations, oxLDL increased the MTT activity of all osteoblastic models (Dunnett's $P < 0.001$ from 10 $\mu\text{g/ml}$), whereas higher concentrations led to a reduction of the activity (Dunnett's $P < 0.001$ from 150 $\mu\text{g/ml}$ for MG-63 and primary cultures of murine osteoblasts, and from 200 $\mu\text{g/ml}$ for the other cells). We previously reported that high concentrations of oxLDL could cause a decrease in MTT activity which correlated to cell death by apoptosis, corroborated by Annexin V staining, the loss of lysosome integrity and DNA fragmentation (6). In contrast, native LDL increased the MTT activity of MG-63 cells, BMSC and mOB after 48h of incubation in a dose-dependent manner (ANOVA, $P < 0.0001$). Native LDL particles did not alter the MTT activity of SaOS, U2 OS and MC3T3 cells. As shown in Fig. 1B, oxLDL (20 $\mu\text{g/ml}$) increased the MTT activity (ANOVA, $P < 0.001$), leading to a significant augmentation at 9h to 48 h (Dunnett's, $P < 0.01$) whereas the MTT activity declined thereafter and was not significantly different from controls at 72h. A similar time-dependent decline of MTT activity was

observed with MC3T3 cells (Fig. 1B). As oxLDL induced comparable hormesis-like biphasic responses in all the osteoblastic models analysed, subsequent experiments were performed with MG-63 which was the most responsive cell line.

Effects of oxysterols on MG-63 cells

We further evaluated the effects of 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol, two oxysterols, detected in atherosclerotic lesions (7), formed by the copper-catalyzed oxidation of LDL on the MTT activity by MG-63 cells. As shown in Fig. 2A, low concentrations of 7 β -hydroxycholesterol (from 5 μ M) increased the MTT activity after 48 h (Dunnett's, $P < 0.05$) whereas higher concentrations (above 30 μ M) led to a reduction of the activity (Dunnett's, $P < 0.001$). On the other hand, increasing concentrations of 7-ketocholesterol reduced the MTT activity in a dose dependent manner (ANOVA, $P < 0.001$) from 20 μ M (Dunnett's, $P < 0.001$) (Fig. 2A). The increase in MTT activity by 7 β -hydroxycholesterol was shown to be time dependent (Dunnett's $P < 0.01$) and as observed for oxLDL, was absent at 72 h (Fig. 2B). Lysophosphatidylcholine, another main component of oxLDL, did not alter the MTT activity of MG-63 cells (data not shown).

Effects of oxidized LDL on cell division of MG-63 cells

Given that an increased MTT activity is usually regarded as representative of cell proliferation, the effect of nLDL and oxLDL on division was further determined by estimation of total cell counts and measurement of the decrease in CFSE fluorescence, associated with cytokinesis. As shown in Fig. 3A and B, the number of cells and the relative cell division, determined by the decrease in CFSE fluorescence, occurred in the presence of 200 μ g/ml of nLDL which confirms the stimulation of cell proliferation by nLDL as suggested by the increased MTT activity. In addition, low concentrations of oxLDL (10 and 20 μ g/ml) also increased significantly the cell number and relative cell division. As expected, concentrations of oxLDL from 50 μ g/ml significantly reduced the cell number (Dunnett's, $P < 0.01$) and reduced cell division evaluated by CFSE fluorescence when compared to low cell proliferation rate in control condition with the culture medium alone (Fig. 3A and B). It should be

noted that cell number with 50 $\mu\text{g/ml}$ of oxLDL was not different compared to the basal (Basal) condition prior to the 48h-period of incubation, which indicates the absence of cell proliferation. Furthermore when the relative MTT activity was normalized according to the relative cellular protein content (Fig. 3C, ANOVA $P < 0.0001$) or cell number (Fig. 3D), a ratio above 1 was revealed for cells treated with 20 and 50 $\mu\text{g/ml}$ of oxLDL, which argues for a significant discrepancy between the MTT activity and cell proliferation at these concentrations. Nevertheless, for concentrations of oxLDL above 100 $\mu\text{g/ml}$, the ratio of MTT activity to cellular protein or cell number was approximately 1 confirming osteoblastic cell death as we have previously reported (6). Therefore, our results indicate that part of the increased MTT activity induced by low concentrations of oxLDL corresponds to cell proliferation and that high concentrations of oxLDL induced cell death, which are characteristic of the oxLDL-induced hormesis-like effect. As a discrepancy between the MTT activity and cell proliferation at low concentrations of oxidized LDL was observed, the nature of the increased MTT activity promoted by 10, 20 and 50 $\mu\text{g/ml}$ of oxLDL was studied.

MTT activity and lysosomal function

As oxLDL particles are known to disturb lysosomal function (27) and as MTT activity has been associated with an increase in endosome and lysosome's enzymatic activity (30), the correspondence between oxLDL-induced increased MTT activity and lysosomal activity was evaluated. As shown in Fig. 4A, incubation of MG-63 cells with low concentrations of oxLDL for 48 h led to an increase in cell autofluorescence, which suggests the presence of undegradable lipofuscin/ceroid-like materials. The mitochondrial respiratory chain inhibitor sodium azide had no effect on basal or oxLDL-induced cellular autofluorescence suggesting that the latter fluorescence may be associated with an accumulation of lipofuscin/ceroid material (data not shown). We hypothesized that a compensatory increase in cell endosomal/lysosomal activity could account for the increased MTT activity. As shown in Fig. 4B, no increase in the cellular content of acidic compartments was revealed in cells incubated for 24h with low concentrations of oxLDL following the staining of acidic organelles with acridine

orange. Moreover, the inhibition of lysosomal function by the addition of chloroquine prior to MTT activity assays did not alter the MTT activity of the cells either in the absence or presence of low concentrations of oxLDL (Fig. 4B).

Effects of oxidized LDL on mitochondrial mass and cell size

Cellular hypertrophy has been reported in human umbilical vein endothelial cells exposed to oxLDL (44) and could account for the discrepancy between the MTT activity due to increased cell volume and organelle mass without an increase in cell number. Therefore, we evaluated the effect of oxLDL on mitochondria mass and cell size. Results in Fig. 5A show that low concentrations of oxLDL do not increase the mitochondrial mass of MG-63 cells (ANOVA, $P=0.1680$). Similar results were obtained with 7β -hydroxycholesterol (data not shown) and therefore increased mitochondrial mass did not account for the increased MTT activity. Moreover oxLDL and 7β -hydroxycholesterol did not affect the cell size of MG-63 cells (data not shown).

Effects of oxidized LDL on the mitochondrial membrane potential and the production of ROS

As the increase in the MTT activity of MG-63 cells by oxLDL may results from an imbalance in mitochondrial activity, the mitochondria membrane potential was measured using JC-1. As shown in Fig. 5B, low concentrations of oxLDL increased the mitochondrial membrane potential in MG-63 cells. For comparison, incubation of MG-63 cells with the known mitochondria uncoupler FCCP was associated with mitochondria depolarization as revealed by reduced ratio of red/green fluorescence (Fig. 5B). As the hyperpolarization of mitochondria has been associated with the production of ROS, the levels of ROS in MG-63 cells incubated with low concentrations of oxLDL were further measured. As shown in Fig. 5C, the experimental concentrations of oxLDL used induced the production of ROS in MG-63 cells. Similarly to oxLDL, low concentrations of 7β -hydroxycholesterol induced mitochondria hyperpolarization (Fig. 5B) and the production of ROS (Fig. 5C).

Relationship between ROS levels and MTT activity

As part of the intracellular reduction of MTT has been associated with superoxide production (9), we determined if the production of ROS induced by oxLDL was associated with the increased MTT activity by MG-63 cells. As shown in Fig. 6A, incubation of cells with the antioxidant NAC prior to treatments with low concentrations of oxLDL did not prevent the increase in MTT activity. Moreover, depletion of cellular ROS scavenger glutathione by incubation with L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO), which increased basal and oxLDL-induced ROS levels (Fig. 6C), did not alter the basal MTT activity nor further increase the MTT activity induced by oxLDL in MG-63 cells (Fig. 6B), but rather reduced the MTT activity induced by oxLDL (two-way ANOVA, $P < 0.001$).

Involvement of flavoenzyme and NAD(P)H on MTT activity

Both mitochondrial and non mitochondrial NAD(P)H- and flavoenzyme-dependent MTT activity have been reported (30). Therefore we hypothesized that the effect of oxLDL on MTT activity by MG-63 cells was associated with flavoenzyme activity and cellular NAD(P)H levels. As shown in Fig. 7A, the addition of flavoenzyme inhibitor DPI for 3 h reduced both basal (ANOVA, $P < 0.003$; Dunnett's $P < 0.05$ from 10 μ M) and oxLDL-induced MTT activity (ANOVA, $P < 0.0001$; Dunnett's $P < 0.01$ from 5 to 60 μ M) in a dose dependent manner. Therefore, our results indicate that DPI reduced in a comparable manner the MTT activity both in control cells as well as in cells treated with oxLDL, which suggests that the latter increase the flavoenzyme activity. Moreover, NAD(P)H-associated cellular fluorescence was also increases by oxLDL (Fig. 7B) and the fluorescence specificity for NAD(P)H was demonstrated by the reduction of fluorescence with FCCP which promotes NADH oxidation.

Effect of oxLDL on the cellular amount of thiol containing proteins

As oxidative stress was shown to be induced by oxLDL in MG-63 cells (Fig. 5C), we postulated that mechanisms involving thiol-containing ROS scavenger proteins may be associated with the maintenance of cellular redox state. Members of the thiol-containing family of proteins undergo reversible oxidation/reduction catalyzed by proteins of the NADPH-dependent thioredoxin-fold family

and thereby, contribute to maintain the redox state of cells (4). As shown in Fig. 8A, thiol content monitored by CMFDA fluorescence measurement was decreased in MG-63 cells following incubation with oxLDL, which indicates increased oxidation of thiol-containing proteins. Moreover, the expression of thiol-containing metallothionein (MT) in cells exposed to oxLDL was increased by 2.5-fold (Fig. 8A) which further suggests the induction of processes, as the conversion of NADP⁺ to NADPH by the pentose-phosphate pathway, in order to maintain the redox state of cells.

The effects of low concentrations of oxLDL on osteoblastic functions

In order to determine the significance of the effects of low concentrations of oxLDL with respect to bone metabolism, we monitored osteoblastic functions under conditions of incubation with low concentrations of oxLDL. As exposure to oxLDL has been associated with increased osteoblastic proliferation with a concomitant reduction of differentiation (39), we determined the alkaline phosphatase activity in MG-63 cells exposed for 48 h to low concentrations of oxLDL. As shown in Fig. 9A, the treatment of MG-63 cells with low concentrations of oxLDL reduced the alkaline phosphatase activity indicating that osteoblastic functions are altered by low concentrations of oxLDL. In addition, we observed that 50 µg/ml of oxLDL reduced the basal migration of MG-63 cells whereas the same concentration of nLDL increased by 2.5-fold the migration (Fig. 9B).

2.2.5. Discussion

Determination of hormesis-like effects induced by oxLDL and oxysterol

Incubation of osteoblastic cell lines with increasing concentrations of oxLDL and 7 β -hydroxycholesterol, an oxysterol usually formed during copper-mediated LDL oxidation, resulted in biphasic MTT activity dose-responses. Such a non-monotonic dose-response relationship agrees with the qualitative characteristic of hormesis where low concentrations of a stressful stimulus trigger a stimulatory response, whereas an inhibitory response occurs at high concentrations (10). Furthermore, quantitative features of hormesis as established by Calabrese and Baldwin (9) were also observed: the average maximum amplitude of the stimulatory response was between 130-160% of the control, and the range of the hormetic zone was 10 to 20-fold. Moreover, the increase in MTT activity induced by oxLDL was time-dependent with a significant augmentation observed at 9h of incubation, a maximal effect occurring at 48 h that was not evident at 72h. Therefore, we show for the first time that oxLDL and 7 β -hydroxycholesterol induce hormesis-like effects in osteoblastic cells. Similar dose- and time-dependent induction of biphasic MTT activity responses by oxLDL have been reported in macrophage cells (16) according to their degree of oxidation. Moreover, similar hormesis-like responses of MTT activity and time-dependent responses have been shown for marrow stromal cells incubated with oxysterol cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol (29).

Both direct stimulation hormesis (DSH) and overcompensation stimulation hormesis (OCSH) have been described with distinct temporal features (10). A disruption of homeostasis characterized as an initial reduction of end-point function monitored, a modest overcompensation, the reestablishment of homeostasis, and the adaptive nature of the process, are all key conceptual features of OCSH. In contrast, DSH does not result from a disrupted homeostasis but represents a direct stimulatory response to initial stimuli, operating within normal maintenance functions without initial reduction of end-point function. In the current study, MTT activity was the endpoint function monitored and did not show any initial reduction from 4 h. Therefore, our results more likely correspond to DSH.

Correspondence of MTT activity with cell proliferation and death

As the stimulatory MTT response triggered by low concentrations of oxLDL seems at a first glance associated cell proliferation, we further determined the correspondence of the increased MTT activity with cell division. Our results indicate that part of the increase in MTT activity reflects a stimulation of osteoblastic cell proliferation by low concentrations of oxLDL. Accordingly, Parhami et al (39) have reported that minimally oxidized LDL particles promote cell proliferation and inhibit the differentiation of MC3T3 bone cells based on evidence of increased [^3H]-thymidine incorporation and inhibition of the induction of alkaline phosphatase as a marker for osteoblastic differentiation. On the other hand, our data affords arguments that suggest potential discrepancies between the increased MTT activity and cell proliferation of MG-63 cells. First, a significant increase in MTT activity was seen as soon as 9h after the addition of oxLDL to the incubation media. Under high cell proliferation rate in the presence of serum, MG-63 cells rather showed a doubling time of 28h (22). Therefore, completion of cell cycle which would be associated with increased cell number and MTT activity within 9h is unlikely. Moreover, a ratio above 1 was shown when the relative MTT activity was normalized by relative cell number or cellular protein content. Therefore, part of the increased MTT activity by osteoblastic cells incubated with oxLDL was of another nature.

Our data also indicates that high concentrations of oxLDL particles promote an inhibitory response evidenced by the reduction of MG-63 cell viability, indicated by the loss of MTT activity and the reduction of cell number. Accordingly, we (6) and others (20, 29) have reported that oxLDL particles induce the apoptosis of osteoblastic cells followed by annexin V staining, DNA fragmentation, loss of lysosomal integrity and appearance of pro-apoptotic proteins. Furthermore, increasing concentrations of oxysterols such as 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol resulted in the reduction of MG-63 cell viability (from 20-30 μM) as indicated by the loss of MTT activity after 48 h of incubation. Our results agree with studies of Liu et al. (29), which showed that concentrations above 15 μM of

oxysterol cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol promote cell death of primary rat bone marrow cells after 2 days of culture.

Oxidized LDL and lysosome activity

Given that a discrepancy was shown between MTT activity and cell proliferation for osteoblastic cells incubated with oxLDL, we further characterized the nature of the oxLDL-induced increase in MTT activity. Inhibition of lysosomal activity by chloroquine and acidic compartment staining with acridine orange indicated that the increased osteoblastic MTT activity induced by oxLDL was not associated with enhanced endosomal/lysosomal activity. Nevertheless, we observed that incubation of MG-63 cells with low concentrations of oxLDL was associated with an increase in cell autofluorescence, which suggest the presence of lipofuscin/ceroid-like materials. Lipofuscin/ceroid formation results from the progressive accumulation of biological "garbage" material, such as defective mitochondria, cytoplasmic protein aggregates as an intralysosomal undegradable material, with bright, wide-spectrum autofluorescence (8). It has been shown that after their uptake into macrophage lysosomes by receptor-mediated endocytosis, oxLDL particles are poorly degraded, resulting in ceroid-containing foam cells (27). Moreover, oxLDL-induced cytotoxicity in macrophages (26) and in osteoblasts (6) has been associated with lysosomal rupture. Our results suggest for the first time that oxLDL particles may promote lipofuscin/ceroid accumulation in osteoblastic cells.

Effects of oxidized LDL on mitochondria of osteoblastic cells

We suspected that the increase in MTT activity could correspond to increased mitochondrial mass or metabolic activity. Such an increase in mitochondrial mass under oxidative stress conditions has been reported (24, 25). However our results showed that the mitochondrial mass was not increased by oxLDL and therefore cannot account for the oxLDL-induced increase in MTT activity. However, low concentrations of oxLDL induced mitochondrial membrane hyperpolarization in osteoblastic cells as has been reported in Caco-2 intestinal cells exposed to oxLDL (15). Mitochondrial hyperpolarization has been described as an early apoptotic event (34), and has been associated with an exponential

increase in ROS production (21), being a major contributor to the oxidative signal induced by oxLDL (53). Accordingly, our results indicate that oxLDL particles stimulate the production of ROS in MG-63 cells. Therefore, mitochondrial hyperpolarization induced by low concentrations of oxLDL in osteoblastic cells may be part of the hormesis stimulatory response necessary to compensate and maintain the cellular metabolic homeostasis, disrupted by the stressful stimulus. However a higher metabolic rate is also associated with the production of ROS, which may subsequently culminate in apoptosis. Since MTT activity has been associated with cellular superoxide production (9), the oxLDL-induced ROS production could result in the augmentation of MTT activity. However, the use of antioxidant NAC or BSO did not modify the oxLDL-induced increase in MTT activity in osteoblastic cells, suggesting that the increase in MTT activity is not associated with intracellular ROS levels.

Association of the increased MTT activity with NAD(P)H-dependent mechanisms for the reduction of cellular thiols

As we report that oxLDL particles promote the production of ROS in osteoblastic cells, we suspected that pathways involved in ROS scavenging, such as thiol proteins, may be triggered. Accordingly, the cellular content of reduced thiol was decreased by exposure to oxLDL and the expression of thiol-containing metallothionein was increased. Moreover, the depletion of cellular ROS scavenger glutathione by incubation with BSO increased the levels of ROS induced by oxLDL and reduced the MTT activity induced by oxLDL suggesting that under these conditions the levels of ROS may not be regulated, which leads to an accentuation of loss of cell viability. Flavoenzymes use flavin as coenzyme in a variety of electron transfer reactions required for energy production, biosynthesis, and more particularly in detoxification and electron scavenging pathways. Key flavoenzymes in defence against oxidative stress are members of the thioredoxin-fold family of proteins (thioredoxin and glutaredoxin), which catalyze the NADPH-dependent reduction of protein thiols in order to maintain the redox state of cells. Our results showed that oxLDL particles increase NAD(P)H cellular fluorescence. We also reported that the increased MTT activity induced by oxLDL was inhibited by the flavoenzyme inhibitor DPI. Therefore, the stimulation in MTT activity induced by oxLDL in

osteoblastic cells may correspond to an increase in compensatory mechanisms implicated in the maintenance of a reduced state of cellular thiols.

OxLDL-induced hormesis in osteoblastic cells and bone metabolism

As shown by our results, induction of a hormesis-like response by oxLDL in osteoblastic cells is associated with the stimulation of cell proliferation and ROS production by low concentrations of oxLDL. It is generally accepted that the stimulation of osteoblastic proliferation may compromise their differentiation into competent bone-forming cells (28, 38, 39). In accordance, our results indicate that low concentrations of oxLDL reduced the alkaline phosphatase activity, a marker of osteoblastic maturity. In addition, we showed that oxLDL compromised the migration of osteoblastic cells. Both functions have been shown to play a critical role in bone formation, remodeling and fracture repair (45). Therefore, our current study indicates that low concentrations of oxLDL may alter the bone metabolism by reducing osteoblastic differentiation in favour of uncontrolled cell proliferation and by affecting cell migration. On the other hand, high concentrations of oxLDL cause osteoblastic cell death that will result in reduced bone formation. In summary, our results indicate that oxLDL particles alter osteoblastic cell proliferation, migration and apoptosis rate, and thereby may contribute to alteration of bone metabolism equilibrium and may be responsible for the reduction of bone mass associated with atherogenic conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Denis Flipo for the excellent technical assistance in cytometry analysis.

GRANT

This research was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). P. Hamel is a recipient of a scholarship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

References

1. **Adami S, Braga V, Zamboni M, Gatti D, Rossini M, Bakri J, Battaglia E.** Relationship between lipids and bone mass in 2 cohorts of healthy women and men. *Calcif Tissue Int* 74:136-142, 2004.
2. **Banks LM, Lees B, MacSweeney JE, Stevenson JC.** Effect of degenerative spinal and aortic calcification on bone density measurements in post-menopausal women: links between osteoporosis and cardiovascular disease? *Eur J Clin Invest* 24:813-817, 1994.
3. **Barengolts EI, Berman M, Kukreja SC, Kouznetsova T, Lin C, Chomka EV.** Osteoporosis and coronary atherosclerosis in asymptomatic postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 62:209-213, 1998.
4. **Berndt C, Lillig CH, Holmgren A.** Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H1227-H1236, 2007.
5. **Brisette L, Charest MC, Falstraalt L.** Selective uptake of cholesteryl esters of low-density lipoproteins is mediated by the lipoprotein-binding site in HepG2 cells and is followed by the hydrolysis of cholesteryl esters. *Biochem J* 318 (Pt 3):841-847, 1996.
6. **Brodeur MR, Brisette L, Falstraalt L, Ouellet P, Moreau R.** Influence of oxidized low-density lipoproteins (LDL) on the viability of osteoblastic cells. *Free Radic Biol Med* 44:506-517, 2007.
7. **Brown AJ, Jessup W.** Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 142:1-28, 1999.

8. **Brunk UT, Terman A.** The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem* 269:1996-2002, 2002.
9. **Burdon RH, Gill V, Rice-Evans C.** Reduction of a tetrazolium salt and superoxide generation in human tumor cells (HeLa). *Free Radic Res Commun* 18:369-380, 1993.
10. **Calabrese EJ, Baldwin LA.** Defining hormesis. *Hum Exp Toxicol* 21:91-97, 2002.
11. **Calabrese EJ, Blain R.** The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. *Toxicol Appl Pharmacol* 202:289-301, 2005.
12. **Chen TL.** Inhibition of growth and differentiation of osteoprogenitors in mouse bone marrow stromal cell cultures by increased donor age and glucocorticoid treatment. *Bone* 35:83-95, 2004.
13. **Damelin LH, Alexander JJ.** Metal-induced hormesis requires cPKC-dependent glucose transport and lowered respiration. *Hum Exp Toxicol* 20:347-358, 2001.
14. **Damelin LH, Vokes S, Whitcutt JM, Damelin SB, Alexander JJ.** Hormesis: a stress response in cells exposed to low levels of heavy metals. *Hum Exp Toxicol* 19:420-430, 2000.
15. **Giovannini C, Matarrese P, Scazzocchio B, Sanchez M, Masella R, Malorni W.** Mitochondria hyperpolarization is an early event in oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in Caco-2 intestinal cells. *FEBS Lett* 523:200-206, 2002.
16. **Han CY, Pak YK.** Oxidation-dependent effects of oxidized LDL: proliferation or cell death. *Exp Mol Med* 31:165-173, 1999.
17. **Holvoet P, Harris TB, Tracy RP, Verhamme P, Newman AB, Rubin SM, Simonsick EM, Colbert LH, Kritchevsky SB.** Association of high coronary heart disease risk status with

circulating oxidized LDL in the well-functioning elderly: findings from the Health, Aging, and Body Composition study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1444-1448, 2003.

18. **Holvoet P, Jenny NS, Schreiner PJ, Tracy RP, Jacobs DR.** The relationship between oxidized LDL and other cardiovascular risk factors and subclinical CVD in different ethnic groups: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis* 194:245-252, 2007.
19. **Holvoet P, Van Cleemput J, Collen D, Vanhaecke J.** Oxidized low density lipoprotein is a prognostic marker of transplant-associated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:698-702, 2000.
20. **Klein BY, Rojansky N, Ben Yehuda A, Abou-Atta I, Abedat S, Friedman G.** Cell death in cultured human Saos2 osteoblasts exposed to low-density lipoprotein. *J Cell Biochem* 90:42-58, 2003.
21. **Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA.** High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 416:15-18, 1997.
22. **Labelle D, Jumarie C, Moreau R.** Capacitative calcium entry and proliferation of human osteoblast-like MG-63 cells. *Cell Prolif* 40:866-884, 2007.
23. **Lajeunesse D, Meyer RA, Jr., Hamel L.** Direct demonstration of a humorally-mediated inhibition of renal phosphate transport in the Hyp mouse. *Kidney Int* 50:1531-1538, 1996.
24. **Lee CF, Chen YC, Liu CY, Wei YH.** Involvement of protein kinase C delta in the alteration of mitochondrial mass in human cells under oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 40:2136-2146, 2006.
25. **Lee HC, Yin PH, Lu CY, Chi CW, Wei YH.** Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J* 348 Pt 2:425-432, 2000.

26. **Li W, Yuan XM, Brunk UT.** OxLDL-induced macrophage cytotoxicity is mediated by lysosomal rupture and modified by intralysosomal redox-active iron. *Free Radic Res* 29:389-398, 1998.
27. **Li W, Yuan XM, Olsson AG, Brunk UT.** Uptake of oxidized LDL by macrophages results in partial lysosomal enzyme inactivation and relocation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:177-184, 1998.
28. **Lian JB, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ.** Transcriptional control of osteoblast differentiation. *Biochem Soc Trans* 26:14-21, 1998.
29. **Liu H, Yuan L, Xu S, Wang K, Zhang T.** Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol inhibits osteoblastic differentiation and promotes apoptosis of rat bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 96:198-208, 2005.
30. **Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D.** Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 69:581-593, 1997.
31. **Lougheed M, Steinbrecher UP.** Mechanism of uptake of copper-oxidized low density lipoprotein in macrophages is dependent on its extent of oxidation. *J Biol Chem* 271:11798-11805, 1996.
32. **Mackie EJ.** Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol* 35:1301-1305, 2003.
33. **Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, Polidori MC, Catani M, Moecocchi P, Senin U, Pacifici R, Cherubini A.** Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1523-1527, 2003.

34. **Matsuyama S, Llopis J, Deveraux QL, Tsien RY, Reed JC.** Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat Cell Biol* 2:318-325, 2000.
35. **Moreau R, Aubin R, Lapointe JY, Lajeunesse D.** Pharmacological and biochemical evidence for the regulation of osteocalcin secretion by potassium channels in human osteoblast-like MG-63 cells. *J Bone Miner Res* 12:1984-1992, 1997.
36. **Nyssen-Behets C, Duchesne PY, Dhem A.** Structural changes with aging in cortical bone of the human tibia. *Gerontology* 43:316-325, 1997.
37. **Orozco P.** Atherogenic lipid profile and elevated lipoprotein (a) are associated with lower bone mineral density in early postmenopausal overweight women. *Eur J Epidemiol* 19:1105-1112, 2004.
38. **Parhami F, Jackson SM, Tintut Y, Le V, Balucan JP, Territo M, Demer LL.** Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 14:2067-2078, 1999.
39. **Parhami F, Morrow AD, Balucan JP, Leitinger N, Watson AD, Tintut Y, Berlinger JA, Demer LL.** Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:680-687, 1997.
40. **Parhami F, Tintut Y, Beamer WG, Gharavi N, Goodman W, Demer LL.** Atherogenic high-fat diet reduces bone mineralization in mice. *J Bone Miner Res* 16:182-188, 2001.

41. **Poli A, Bruschi F, Cesana B, Rossi M, Paoletti R, Crosignani PG.** Plasma low-density lipoprotein cholesterol and bone mass densitometry in postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 102:922-926, 2003.
42. **Ramseier E.** Untersuchungen über arteriosklerotische veränderungen der knochenarterien. *Virchows Arch Path Anat* 336:77-86, 1962.
43. **Schmidt CM, Cheng CN, Marino A, Konsoula R, Barile FA.** Hormesis effect of trace metals on cultured normal and immortal human mammary cells. *Toxicol Ind Health* 20:57-68, 2004.
44. **Seibold S, Schurle D, Heinloth A, Wolf G, Wagner M, Galle J.** Oxidized LDL induces proliferation and hypertrophy in human umbilical vein endothelial cells via regulation of p27Kip1 expression: role of RhoA. *J Am Soc Nephrol* 15:3026-3034, 2004.
45. **Stains JP, Civitelli R.** Cell-to-cell interactions in bone. *Biochem Biophys Res Commun* 328:721-727, 2005.
46. **Steinberg D.** Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 272:20963-20966, 1997.
47. **Tintut Y, Morony S, Demer LL.** Hyperlipidemia promotes osteoclastic potential of bone marrow cells ex vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:E6-E10, 2004.
48. **Uyama O, Yoshimoto Y, Yamamoto Y, Kawai A.** Bone changes and carotid atherosclerosis in postmenopausal women. *Stroke* 28:1730-1732, 1997.
49. **von der RP, Hansen MA, Hassager C.** The association between low bone mass at the menopause and cardiovascular mortality. *Am J Med* 106:273-278, 1999.

50. **Yamaguchi T, Sugimoto T, Yano S, Yamauchi M, Sowa H, Chen Q, Chilhara K.** Plasma lipids and osteoporosis in postmenopausal women. *Endocr J* 49:211-217, 2002.
51. **Yang P, He XQ, Peng L, Li AP, Wang XR, Zhou JW, Liu QZ.** The role of oxidative stress in hormesis induced by sodium arsenite in human embryo lung fibroblast (HELFL) cellular proliferation model. *J Toxicol Environ Health A* 70:976-983, 2007.
52. **Zettler ME, Prociuk MA, Austria JA, Massaeli H, Zhong G, Pierce GN.** OxLDL stimulates cell proliferation through a general induction of cell cycle proteins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H644-H653, 2003.
53. **Zmijewski JW, Moellering DR, Le Goffe C, Landar A, Ramachandran A, Darley-USmar VM.** Oxidized LDL induces mitochondrially associated reactive oxygen/nitrogen species formation in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H852-H861, 2005.

2.2.6. Figure legends

Fig. 1. **Effects of oxidized LDL on MTT activity by osteoblastic cells.** (A) Cells were incubated for 48h with increasing concentrations of native LDL, oxLDL or culture medium. MTT activity was determined as described in the Material and methods section. B) Cells were incubated for different time intervals with 20 μ g/ml of oxLDL and the MTT activity was determined. Data are expressed as the relative MTT activity (mean \pm SEM) compared to control conditions without lipoprotein from at least 3 independent experiments performed in tetraplicate.

Fig. 2. **Effects of oxysterols on MG-63 cells.** A) Cells were incubated for 48 h with increasing concentrations of 7 β -hydroxycholesterol or 7-ketocholesterol and MTT activity was determined. B) Cells were incubated for different intervals of time with 10 μ M of 7-ketocholesterol (7-ketoChol) or 7 β -hydroxycholesterol (7OHChol) and the MTT activity was determined. Data are expressed as the relative MTT activity (mean \pm SEM) compared to control conditions without oxysterol from at least 3 independent experiments performed in triplicate.

Fig. 3. **Effects of oxidized LDL on cell division of MG-63.** Cells were incubated either with 200 μ g/ml of nLDL, various concentrations (μ g/ml) of oxLDL or in culture medium (0 μ g/ml) for 48h. Thereafter, cell numbers (A) were determined by flow cytometer and cell division (B) was followed by the decrease in CFSE fluorescence as described in the Material and Methods section. Data represent means \pm SEM for 6 to 8 independent experiments expressed as the relative cell numbers compared to control condition or the relative cell division (1/ratio of CFSE fluorescence of treated vs control cells). Basal cell number prior to the 48h incubation period is shown. One-way ANOVA, Dunnett's: $^{\text{f}}$ P<0.05 and $^{\text{ff}}$ P<0.01 for significant reduction compared to the control condition without lipoprotein, *P<0.05 and

**P<0.01 for significant increase compared to the control condition without lipoprotein; Two-tailed Student t test: [#]P<0.01, significant increase compared to the control condition without lipoprotein. C and D) Relative MTT activities were normalized according to relative cellular protein content or relative cell number respectively. Data are the mean \pm SEM from at least 3 independent experiments. One-way ANOVA, Dunnett's: *P<0.05 and **P<0.01 for significant increase compared to the control condition without lipoprotein.

Fig. 4. **Determination of lysosomal-dependent MTT activity.** A) Cells were incubated in culture medium (CTL) or with 20 μ g/ml of oxLDL for 48h. *Left panel* shows representative cellular autofluorescence monitored as described in the Materials and methods section with the corresponding phase contrast image. *Right panel:* Data are expressed as the mean \pm SEM of the relative autofluorescence compared to control condition from at least 3 independent experiments. One-way ANOVA, Dunnett's: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared to control condition without lipoprotein. B) Cells were incubated in culture medium (CTL) or with 20 μ g/ml of oxLDL for 48h and acridine orange staining was performed (left panel: representative image). *Right panel:* Cells were incubated in culture medium (0 μ g/ml) or with 20 μ g/ml of oxLDL for 24h. Cells were preincubated with increasing concentrations (μ M) of chloroquine for 1h and MTT activity was determined thereafter as described in the Materials and methods section. Data are expressed as the mean \pm SEM of the relative MTT activity compared to control condition without lipoprotein from at least 3 independent experiments. Two-tailed Student t test: **P<0.01, ***P<0.001 compared to control condition without lipoprotein.

Fig. 5. **Effects of oxidized LDL on mitochondria mass, membrane potential and ROS production in MG-63 cells.** A) Cells were incubated in culture medium (0 μ g/ml)), 200 μ g/ml of nLDL or increasing concentrations (μ g/ml) of oxLDL for 48h. Thereafter cells

were analysed by flow cytometry for determination of the mitochondria mass using the MitoTracker green. Data are the mean \pm SEM expressed as the relative mitochondria mass compared to control condition from 5 individual experiments. (B) Cells were incubated with 200 μ g/ml of nLDL, with various concentrations of oxLDL (μ g/ml) or 7 β -hydroxycholesterol (7 β OHChol, μ M), or in culture medium (0 μ g/ml) for 24 h and measurement of mitochondria membrane potential by JC-1 was performed as described in the Material and methods section. Incubation for 30 min with FCCP (5 μ M) was used as positive control for mitochondria membrane depolarisation. Data are the mean \pm SEM expressed as the relative JC-1 red vs green fluorescence ratio from at least 3 individual experiments. One-way ANOVA, Dunnett's: * P <0.05, ** P <0.01 for increased ratio compared to control condition; Two-tailed Student t test: \ddagger P <0.05 for reduced ratio compared to control condition. C) *Left*: Cells were incubated with 200 μ g/ml of nLDL, with various concentrations of oxLDL (μ g/ml) or 10 μ M 7 β -hydroxycholesterol (7 β OHChol), or in culture medium (0 μ g/ml) for 1, 3 and 24 h and the ROS levels were determined by CM-H₂DCF-DA fluorescence. Data are the mean \pm SEM expressed as the relative fluorescence vs control condition from at least 3 individual experiments. * P <0.05, one-way ANOVA, Dunnett's compared to control condition; ** P <0.01, *** P <0.001, two-tailed Student t test compared to control condition. *Right*: representative data of CM-H₂DCF-DA fluorescence (FLI-H) for cells incubated in culture medium (CTL) or with 20 μ g/ml of oxLDL for 1h.

Fig. 6. Relationship between MTT activity and the intracellular levels of ROS. A and B) Cells were incubated for 24h with 1mM NAC or 10 μ M BSO prior to treatments with 10, 20 and 50 μ g/ml of oxLDL or in culture medium (0 μ g/ml) in the presence of NAC or BSO for 48h. MTT activity was determined as described in the Material and methods section. The data is expressed as the ratio of MTT activity compared to control conditions (mean \pm SEM) from at least 3 independent experiments performed in triplicate. One-way ANOVA, Dunnett's:

*** $P < 0.001$ compared to the corresponding conditions without lipoprotein. C) Cells were incubated for 24 h without (CTL) or with $10\mu\text{M}$ BSO prior to treatments without ($0\mu\text{g/ml}$) or with various concentrations ($\mu\text{g/ml}$) of oxLDL for 1 and 3h. The ROS levels were determined by CM-H₂DCF-DA fluorescence as described in Materials and methods section. Data represents means \pm SEM expressed as the relative fluorescence vs control condition from at least 3 individual experiments. Two-tailed Student t test: * $P < 0.01$ compared to control condition without BSO, One-way ANOVA, Dunnett's: ^{##} $P < 0.01$ compared to condition without lipoprotein.

Fig. 7. Association of flavoenzymes and NAD(P)H with MTT activity. A) Cells were incubated without ($0\mu\text{g/ml}$) or with various concentrations of oxLDL for 24 h. Subsequently, cells were preincubated with increasing concentrations (μM) of the flavoenzyme inhibitor DPI for 1h and thereafter MTT activity was determined as described in the Materials and methods section. Data are expressed as means \pm SEM of the relative MTT activity compared to the control condition without lipoprotein from at least 3 independent experiments. Two-tailed Student t test: *** $P < 0.001$ compared to the control condition without lipoprotein. B) Cells were incubated in culture medium (CTL) or with 10 or $20\mu\text{g/ml}$ of oxLDL for 48 h. Images are representative NAD(P)H-associated fluorescence analysed as described in the Materials and methods section. Incubation with $5\mu\text{M}$ FCCP for 40 min prior to analysis of fluorescence was performed to determine the fluorescence specificity for NAD(P)H.

Fig. 8. Evaluation of the content of thiol-containing proteins in cells exposed to oxLDL. A) Cells were incubated in culture medium (CTL) or in the presence of $200\mu\text{g/ml}$ nLDL or $20\mu\text{g/ml}$ oxLDL for 24 h. Thereafter, cells were loaded with CMFDA and the fluorescence was analysed by confocal microscopy and values are expressed as means \pm SEM of the relative CMFDA fluorescence compared to values of the control condition from at least 3 independent experiments. Two-tailed Student t test: ** $P < 0.01$ compared to the control condition. B) Cells

were incubated in culture medium (CTL) or in the presence of 20 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL for 24 h. Total RNA was isolated and subjected to RT-PCR using specific primers for human metallothionein 1/2 (MT) and GAPDH. Densitometric determinations were analysed and expressed as the relative MT expression normalized against GAPDH expression when compared to the control condition of 3 independent experiments. Two-tailed Student t test: * $P < 0.05$.

Fig. 9. Effect of low concentrations of oxLDL on osteoblastic functions. A) Cells were incubated in culture medium (CTL) or in the presence of nLDL or oxLDL for 48 h. Then, measurements of alkaline phosphatase activity (ALPase) by cellular protein extracts were performed as described in the Materials and Methods section. The data are expressed as means \pm SEM of the relative ALPase compared to the control condition of 3 independent experiments. Two-tailed Student t test: ** $P < 0.01$ compared to the control condition. B) Cells were grown to confluent monolayer and were wounded by scratching the surface. This initial wounding (0 h) and the movement of the cells in the scratched area after 24 h were photographically monitored. The number of cells that have migrated to the wounded area was determined using imageJ software. The values are expressed as means \pm SEM of the relative cell migration compared to control condition in the culture medium of 3 independent experiments. Two-tailed Student t test: ** $P < 0.01$, significant increase compared to the control condition; $^{\text{f}}P < 0.05$, significant reduction compared to the control condition.

2.2.7. Figures

FIGURE 1

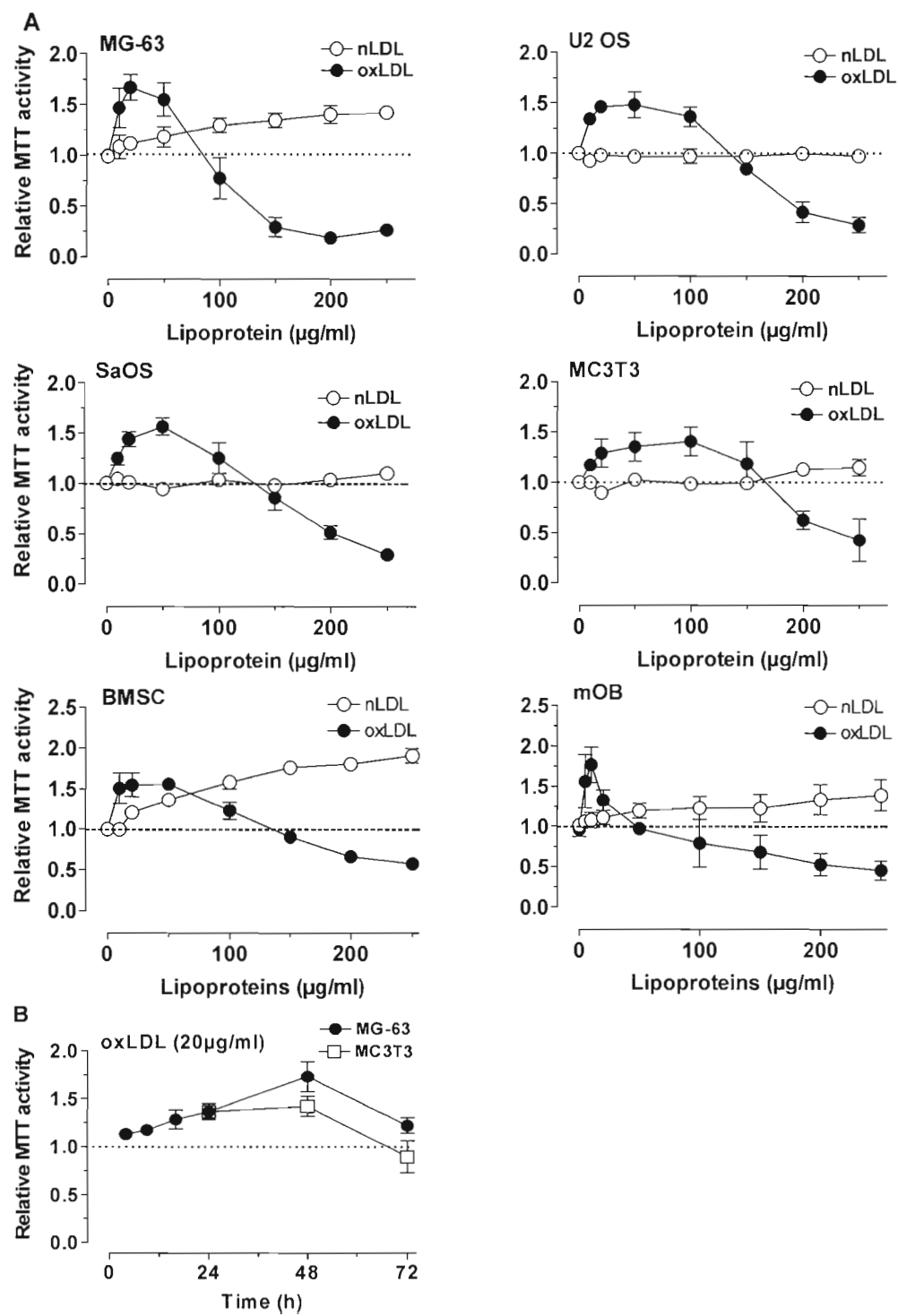


FIGURE 2

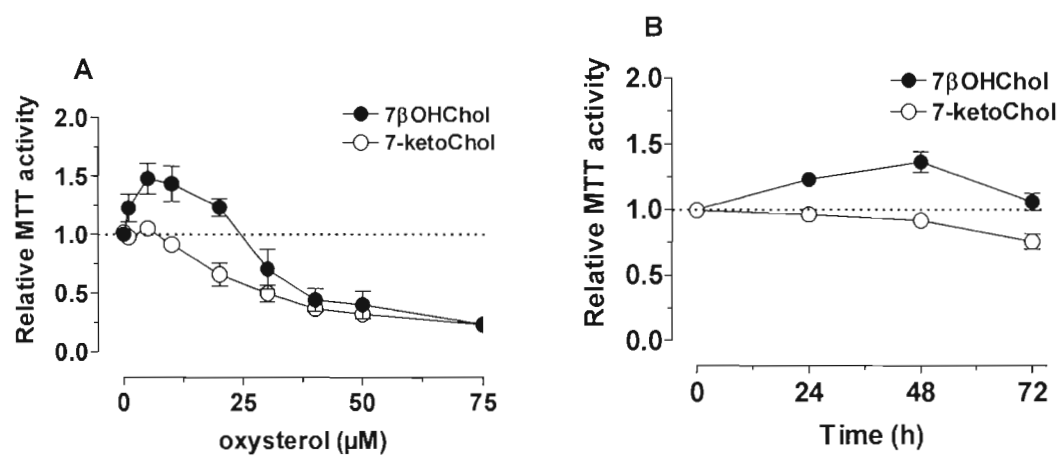


FIGURE 3

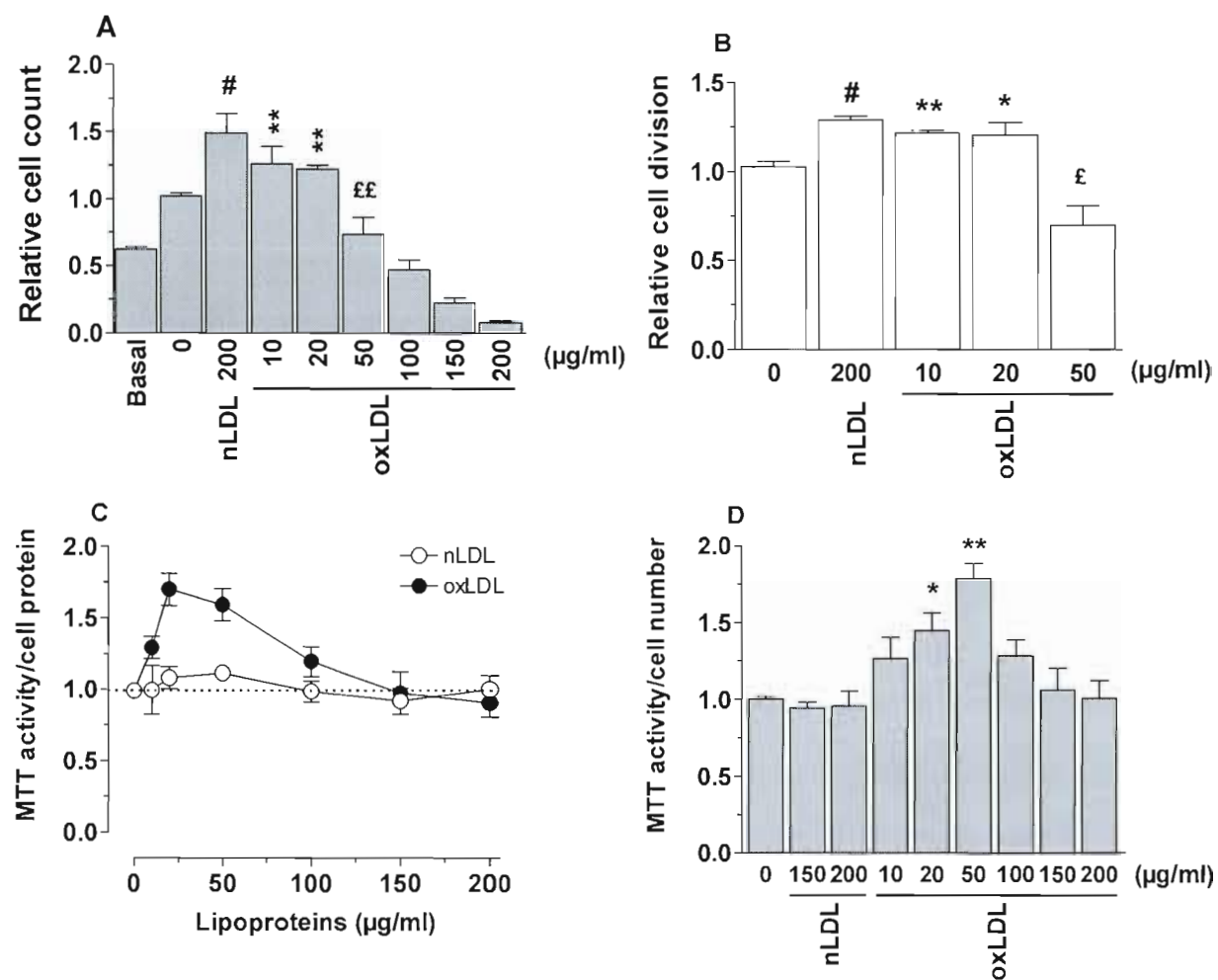
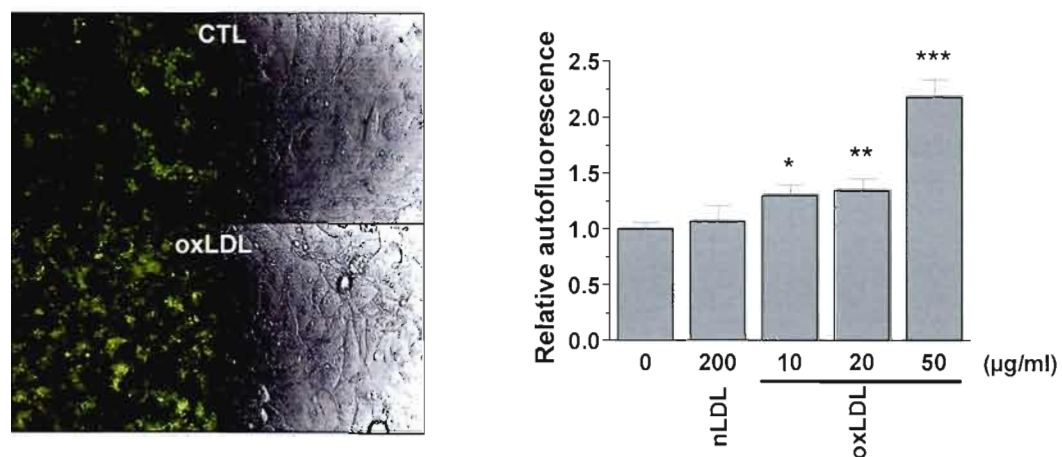


FIGURE 4

A



B

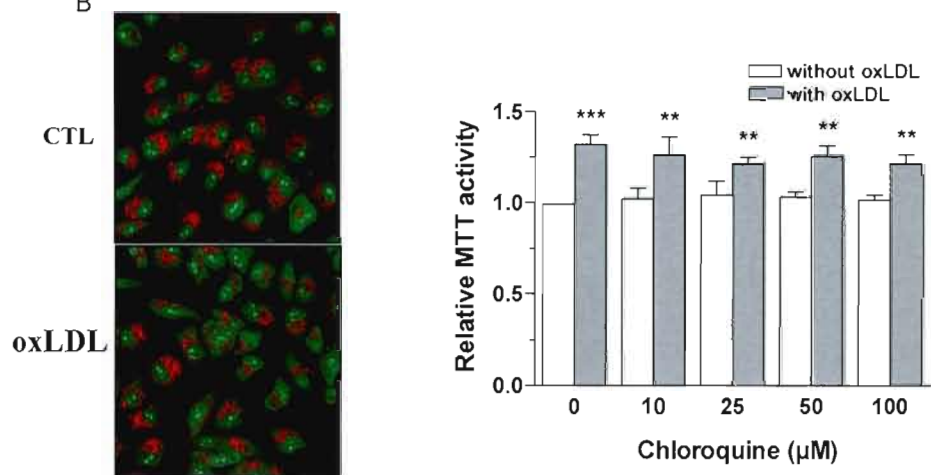


FIGURE 5

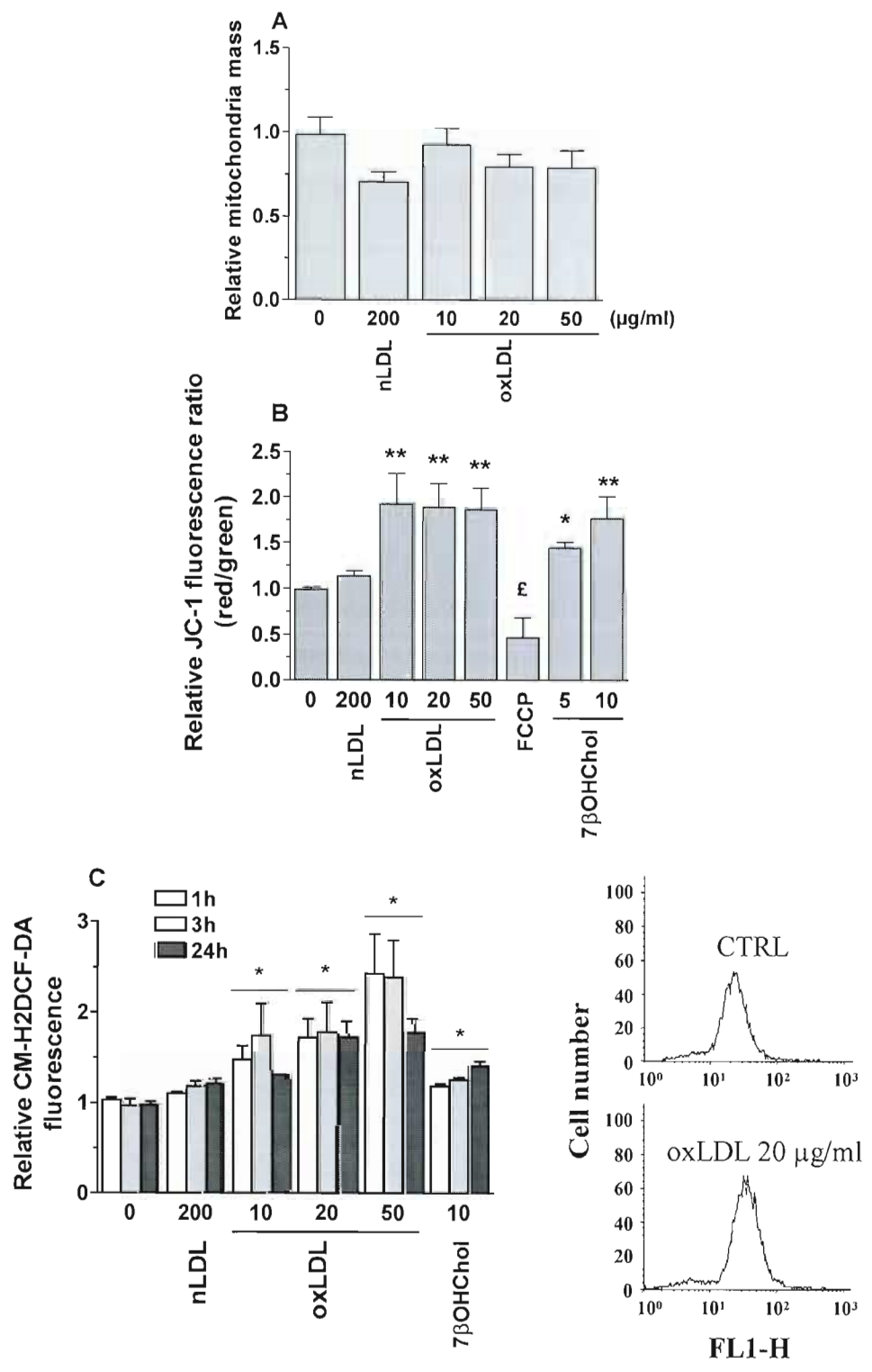


FIGURE 6

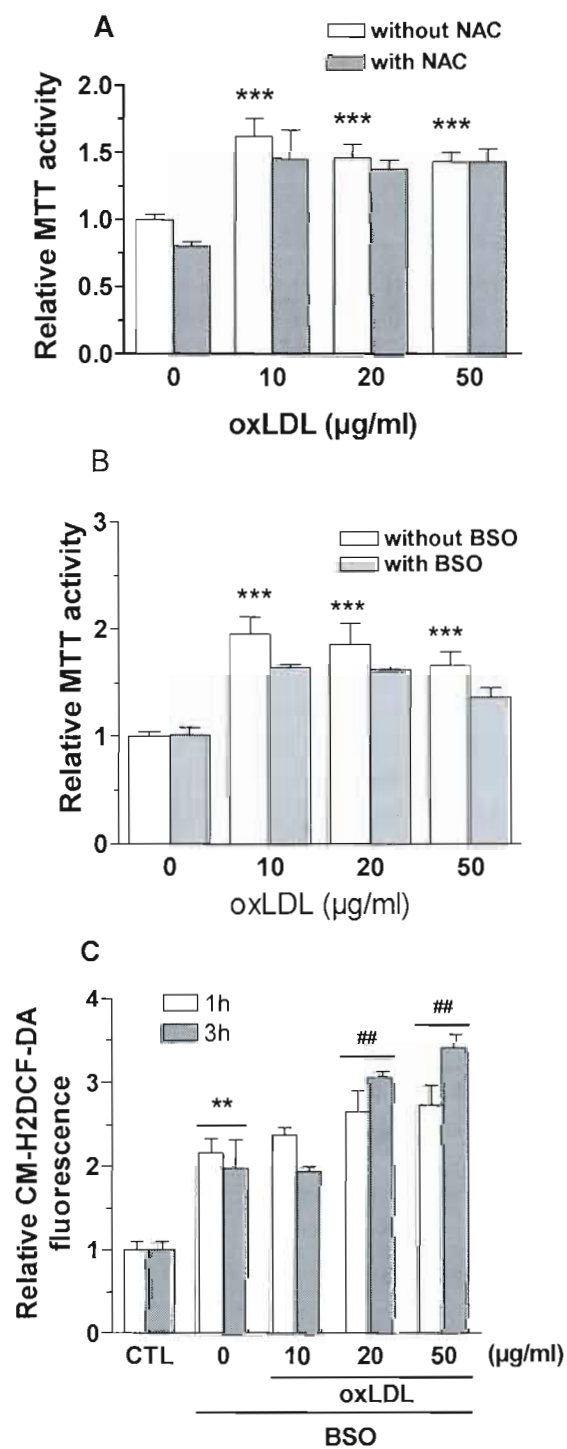


FIGURE 7

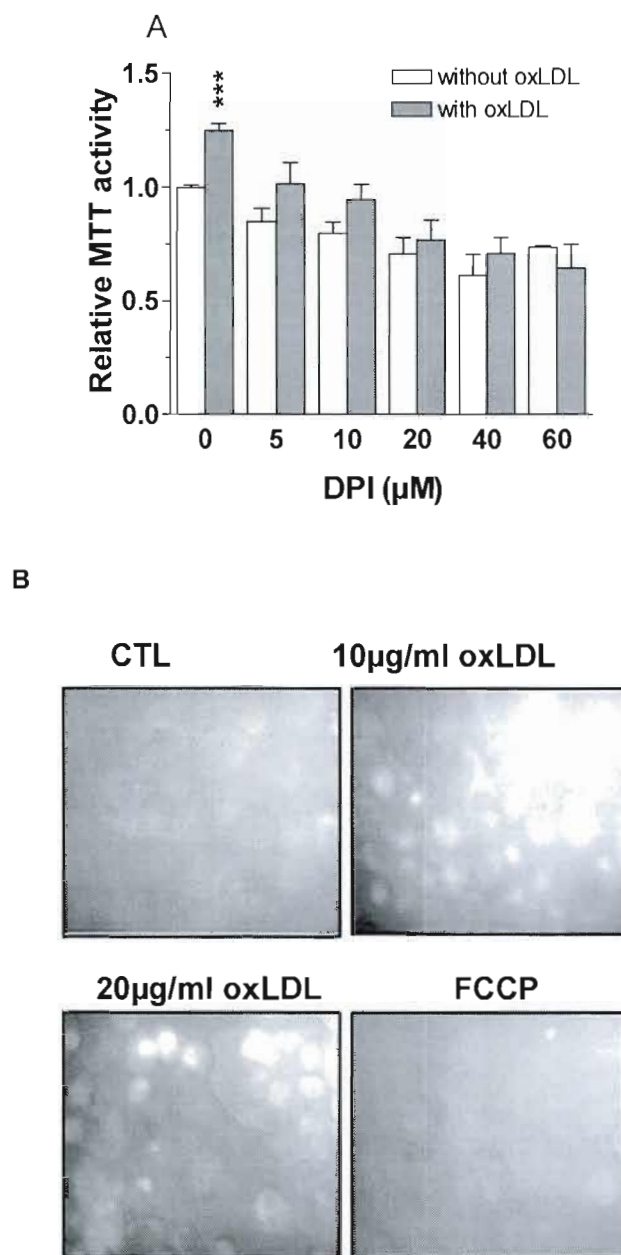


FIGURE 8

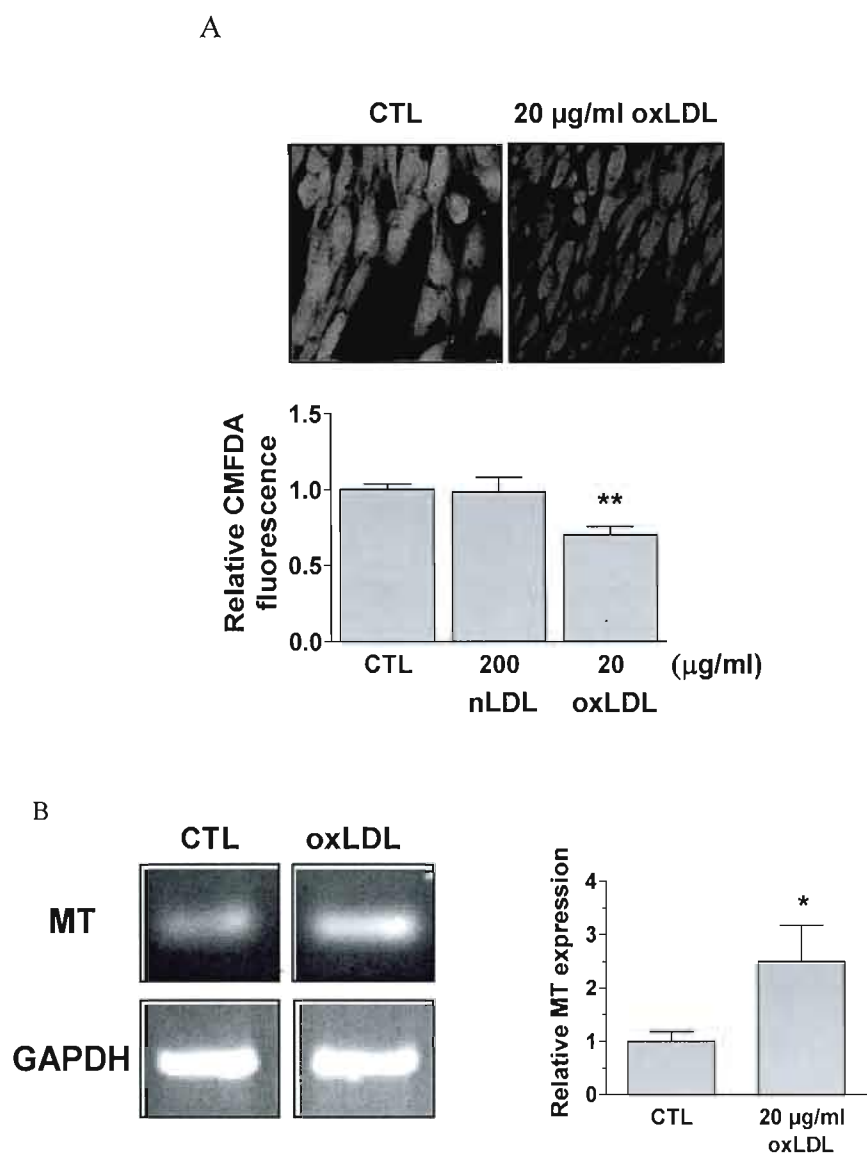
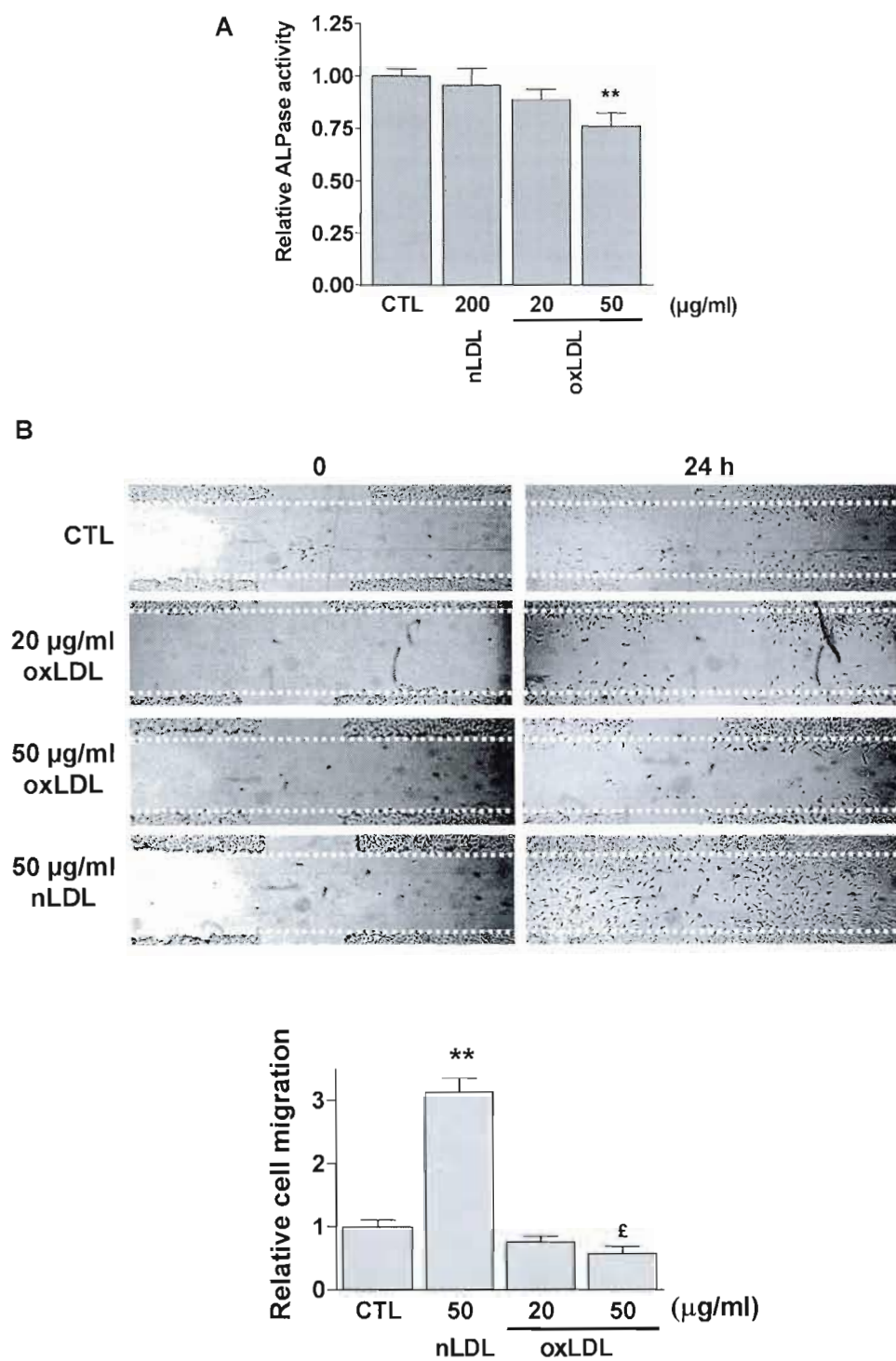


FIGURE 9



2.3. Résultats complémentaires

2.3.1. Matériel et méthodes

Le degré d'oxydation des LDL utilisées dans les traitements cellulaires a été vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose selon Davidsohn et al. (1974). Brièvement, 35 μ l d'échantillons contenant 0.5 μ g de lipoprotéines ont été appliquées dans les puits du gel. L'électrophorèse est de 30 minutes à 23 °C à 80 volts et est effectuée avec l'appareil *SAS-II Plus* de Helena HP system. Les lipoprotéines sont ensuite révélées avec le colorant rouge *Fat Red 7B* dissout dans le méthanol. Finalement une image numérique du gel a été analysée avec le logiciel *QuickScan 2000 WIN*, Version 2,01, ©2004, qui détermine le degré d'oxydation en fonction de la vitesse de migration des particules de lipoprotéines par rapport au standard *lipoprol*, qui provient de sérum humain lyophilisé et reconstitué avec 1 ml d'eau purifiée.

2.3.2. Résultats

Dans le but de valider l'approche expérimentale de l'article, nous avons effectué des essais additionnels, présentés dans les pages suivantes comme résultats complémentaires. De plus, les particules de LDL moyennement oxydées sont connues pour induire la prolifération des VMSC (Harris-Hooker et al., 1992; Rao et Bradford, 1992; Watanabe et al., 2001). Les données montrées dans la section résultats complémentaires permettent de comparer l'effet des mox-LDL sur les cellules ostéoblastiques avec celui des hox-LDL utilisées dans l'article et de vérifier si elles provoquent une prolifération cellulaire. Contrairement aux hox-LDL, les mox-LDL n'ont pas un effet hormésique et ne provoquent pas la prolifération des cellules MG-63, ce qui démontre l'importance de vérifier et connaître le degré d'oxydation des particules de LDL. Enfin, la section résultats complémentaires offre des pistes de réflexion concernant l'origine de l'effet des particules sur les cellules ostéoblastiques en démontrant l'expression de la flavoenzyme NADPH oxydase 4 par les cellules MG-63. En effet, cette enzyme est activée en présence de LDL oxydées chez différents modèles vasculaires (Galle et al., 2001; Thum et Borlak, 2004; Chow et al., 2007), ce qui la positionne comme élément potentiellement impliqué dans la stimulation de l'activité MTT des ostéoblastes en présence de LDL oxydés, tel que présenté dans l'article.

Les nLDL sont graduellement oxydées en LDL oxydées minimalement (mm-LDL), en LDL moyennement oxydées (mox-LDL), puis en LDL fortement oxydées (hox-LDL, appelées oxLDL dans l'article) dans les plaques athérosclérotiques, et après une incubation *in vitro* avec le cuivre (Takei et al., 2001; Witztum, 1991). Il en résulte une altération des composantes de la particule. Entre autres, une augmentation du contenu en peroxydes dérivés des esters de cholestérols et de phosphatidylcholine est retrouvée (Kontush et al., 2003).

La migration périodique des échantillons de lipoprotéines nous a permis de vérifier l'état d'oxydation des particules. L'utilisation de l'appareil électrophorétique *SAS-II Plus* permet de comparer chaque échantillon à un standard (figure S1 A, courbe vide). Ainsi, plus la particule est oxydée, plus elle est chargée négativement, ce qui accroît sa migration vers la cathode (Kontush et al., 2003). Les mox-LDL sont connues pour migrer environ deux fois

plus rapidement que les nLDL (Kontush et al., 2003), ce que nous confirmons avec nos échantillons. Les LDL à la figure S1 sont représentatives de celles utilisées lors des expériences sur les cellules ostéoblastiques. Nos essais de migration des particules ont confirmés que leur altération dans le temps était négligeable et que les particules utilisées possèdent les caractéristiques retrouvées dans la littérature. Nous sommes ainsi en mesure d'affirmer que notre matériel de travail est authentique et qu'il existe une différence d'oxydation marquée entre les espèces de LDL utilisées. Un pic à gauche de la population principale de LDL # 248 apparaît sur la figure S1 A. Il correspond à un début d'oxydation des nLDL, formant une sous-population faiblement oxydée. Dans ce cas, la proportion de la sous-population de LDL correspond à 5,74 % de l'échantillon total. À ce pourcentage, la proportion se situe en deçà de l'écart-type de l'essai MTT qui varie en fonction de la concentration de nLDL entre 6 et 18 % des valeurs compilées pour 48 h d'incubations avec les MG-63 (article, figure 1). Nous pouvons affirmer que l'effet de la sous-population demeure négligeable. Il en est de même pour les mox-LDL, dont une sous-population de hox-LDL est présente à 2 %.

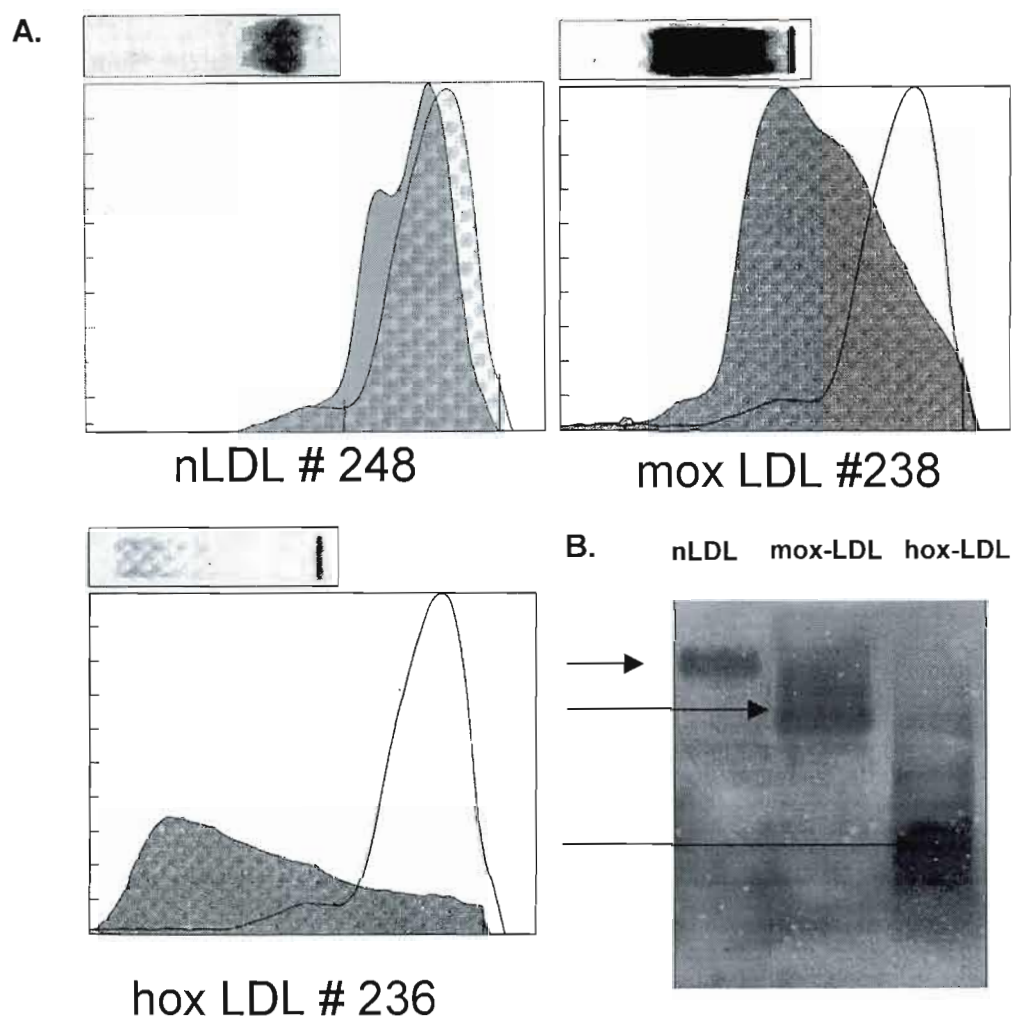


Fig. S1. **Électrophorèse des LDL utilisées.** Le degré d'oxydation des LDL utilisées dans les traitements cellulaires a été vérifié par leur vitesse de migration sur gel à l'aide de l'appareil électrophorétique *SAS-II Plus*. (A) Le profil de migration de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de lipoprotéines est représenté graphiquement de gauche à droite et (B) sur gel de haut en bas.

Nos résultats de l'article indiquent que l'effet des hox-LDL diffère des nLDL au niveau de l'activité réductrice cellulaire et du nombre de cellules ostéoblastiques MG-63 en présence des mêmes concentrations. En effet, la réponse proliférative des MG-63 avec les nLDL corrèle avec l'activité MTT et ne chute pas à fortes concentrations, contrairement aux hox-

LDL. Ainsi, l'oxydation des particules influence leur effet. Afin de vérifier si le degré d'oxydation des LDL influence la réponse cellulaire, nous avons incubés les cellules MG-63 avec des LDL moyennement oxydées (mox-LDL).

À faible concentration de mox-LDL (10, 20 et 50 $\mu\text{g/ml}$), nous obtenons une stimulation de l'activité MTT moyenne allant de 127 à 162 % du contrôle, proportion correspondant à l'hormèse (entre 1,3 et 1,6 fois le contrôle) (figure S2). Toutefois, la fourchette de concentration engendrant une stimulation dépasse celle des hox-LDL. En effet, une stimulation significative est atteinte de 10 $\mu\text{g/ml}$ à 200 $\mu\text{g/ml}$, ce qui dépasse la zone hormétique de facteur 10 obtenue avec les hox-LDL sur différents modèles cellulaires. En plus, la chute d'activité MTT à 250 $\mu\text{g/ml}$ n'est pas inférieure au contrôle. Il n'y a donc pas d'inhibition de la stimulation à fortes concentrations. Ainsi, l'effet des mox-LDL sur l'activité MTT des MG-63 ne possède pas le profil biphasique typique de l'hormèse.

La courbe d'activité MTT en présence de mox-LDL est à mi-chemin entre celle des nLDL et des oxLDL. Tout comme les hox-LDL, la stimulation par les mox-LDL est plus forte qu'avec les nLDL (Test de T : $P < 0,05$ à 50 $\mu\text{g/ml}$) et est significativement supérieure au contrôle à plus faibles concentrations que les nLDL ($P < 0,05$ pour mox- et hox-LDL dès 10 $\mu\text{g/ml}$). En effet, les nLDL ne provoquent une augmentation significative que seulement à partir de 50 $\mu\text{g/ml}$ (ANOVA : $P < 0,05$). Différemment des hox-LDL, la concentration doit atteindre 250 $\mu\text{g/ml}$ de mox-LDL afin qu'il n'y ait plus de différence significative entre l'activité MTT des cellules traitées et les cellules sans lipoprotéine (milieu seul). Cet état est obtenu à 100 $\mu\text{g/ml}$ avec les hox-LDL. Toutefois, il n'est possible de citer qu'une légère tendance à la diminution de la stimulation, et non une perte, tel qu'obtenue avec les hox-LDL. En effet, il n'y a pas de différence significative entre le maximum et le minimum de stimulation de l'activité MTT induite respectivement par 100 $\mu\text{g/ml}$ et 250 $\mu\text{g/ml}$ de mox-LDL (T test $P > 0,05$), contrairement aux hox-LDL avec lesquelles une différence significative est obtenue entre 20 $\mu\text{g/ml}$ et 100 $\mu\text{g/ml}$.

Il n'y a donc qu'une légère diminution sans inhibition ou même perte d'activité MTT avec les mox-LDL, excluant l'hormèse. Cette diminution est plus faible et initiée à plus hautes

concentrations qu'avec les hox-LDL. Les mox-LDL induisent une réponse davantage similaire aux nLDL qu'aux hox-LDL, considérant l'absence de perte de viabilité à fortes concentrations. Ce résultat, conjointement à la littérature selon laquelle les mox-LDL provoquent la prolifération des VMSC (Harris-Hooker et al., 1992; Rao et Bradford, 1992; Watanabe et al., 2001) nous a mené à poser l'hypothèse selon laquelle elles provoquent une augmentation du nombre de cellules chez les MG-63. Ainsi, nous avons par la suite vérifié de quelle façon les mox-LDL affectent la prolifération cellulaire.

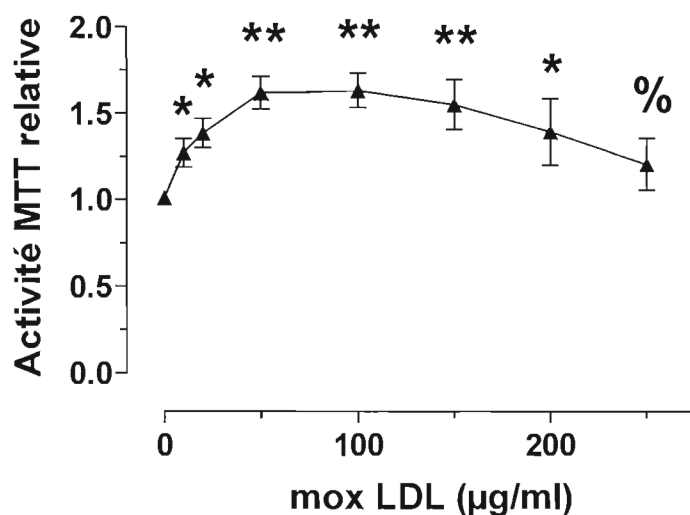


Fig. S2. **Effet de concentrations croissantes de mox-LDL sur l'activité MTT des cellules ostéoblastiques MG-63.** L'activité de réduction du MTT par les cellules pré-ostéoblastiques MG-63 a été mesurée (voir section Matériel et méthodes de l'article) suite à une incubation de 48 heures avec des concentrations croissantes de mox-LDL. Les données représentent la moyenne \pm SEM comparée à une condition sans lipoprotéine (milieu DMEM/F12 seul) d'au moins 3 expériences indépendantes en triplicatas. ANOVA $P < 0.001$, Post-test Dunnet : * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, supérieur au CTL, % pas de différence significative avec le contrôle sans lipoprotéine.

Contrairement aux nLDL et aux hox-LDL, les mox-LDL n'induisent pas de prolifération cellulaire (figure S3). En effet, le nombre de cellules en présence de 20, 50 et 100 $\mu\text{g/ml}$ de mox-LDL pendant 48 heures n'est pas significativement différent du contrôle (milieu de culture sans lipoprotéine). De plus, à des concentrations de 150 et 200 $\mu\text{g/ml}$ il y a moins de cellules (ANOVA $P < 0.05$). Tout comme les hox-LDL, le nombre de cellules résultant d'une incubation pendant 48 heures avec différentes concentrations de mox-LDL ne corrèle pas avec l'activité MTT. Le ratio de l'activité MTT sur le nombre de cellule varie entre 1,25 pour 20 $\mu\text{g/ml}$ et 1,78 pour 200 $\mu\text{g/ml}$, appuyant l'absence de concordance entre l'activité MTT et la prolifération cellulaire. Ainsi, même si une augmentation de l'activité MTT est observée avec de faibles concentrations de mox-LDL (figure S2), aucune prolifération cellulaire n'est obtenue à concentrations correspondantes (figure S3). Ces données suggèrent l'apparition d'un mécanisme similaire à celui proposé pour les hox-LDL responsable de l'accroissement du potentiel réducteur en présence de mox-LDL.

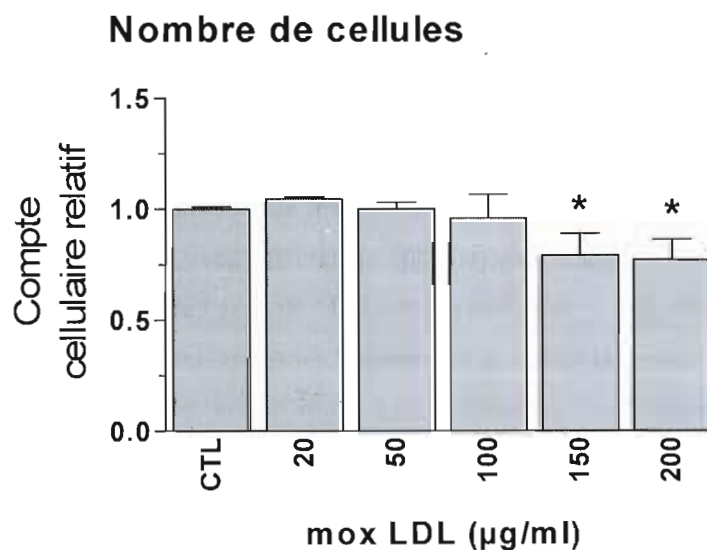


Fig. S3. **Effet de concentrations croissantes de mox-LDL sur le nombre de cellules ostéoblastiques MG-63.** Les cellules MG-63 ont été incubées 48 heures avec les mox LDL. Le nombre relatif de cellules a été déterminé avec un cytofluoromètre (voir section Matériel

et méthodes de l'article) et est exprimé par rapport à la valeur du CTL (milieu seul). Les données représentent la moyenne \pm SEM comparée à un CTL sans traitement (milieu seul) à partir d'au moins 3 expériences indépendantes en triplicatas. ANOVA $P < 0.05$, Post-test Dunnett * $P < 0.05$, inférieur au CTL.

La lyso-phosphatidylcholine est un produit de l'oxydation des LDL impliqué dans le développement de l'athérosclérose (Yamakawa et al., 1998 Siess et al., 1999; Takeshita et al., 2000; Kontush et al., 2003; Huang et al., 2005). Nous avons formulé l'hypothèse qu'elle perturbe la viabilité des cellules MG-63, à la manière du 7β -hydroxycholestérol ou du 7ketocholestérol (article et figure S4). Toutefois, une exposition de 48 heures n'a pas réduit l'activité MTT des cellules MG-63 par rapport au contrôle seul. Ce résultat, conjointement à la dose-réponse avec le 7ketocholestérol dans l'article, confirme que l'augmentation de l'activité réductrice observée avec les lipoprotéines oxydées ou non et avec le 7β -hydroxycholestérol n'est pas uniquement le produit d'un apport en molécules/particules oxydées.

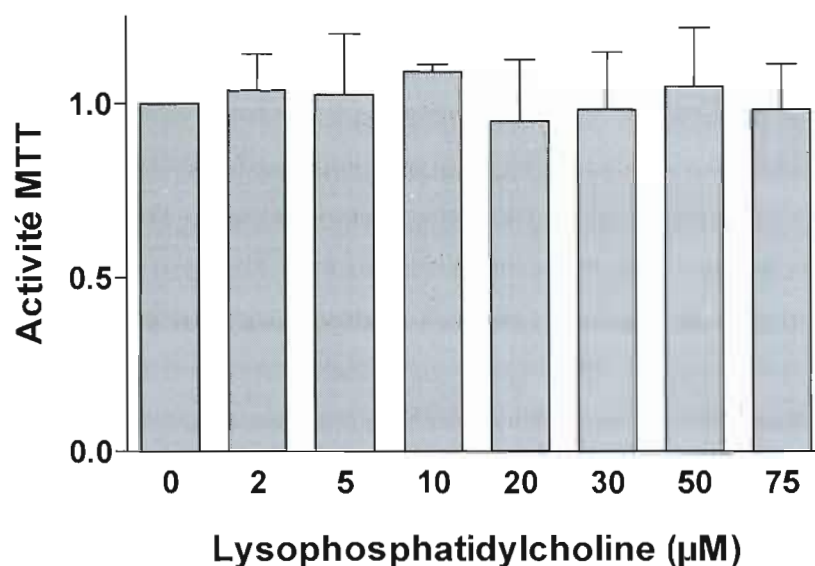


Fig. S4. **Effet de concentrations croissantes de lyso-phosphatidylcholine (LysoPC) sur les cellules MG-63.** Les cellules MG-63 ont été incubées avec la lysoPC pendant 48 heures. L'activité MTT a ensuite été déterminée et est exprimée par rapport à la valeur du milieu seul (0). Les données représentent la moyenne \pm SEM comparée à une condition sans lysoPC (milieu DMEM/F12) à partir d'au moins 3 expériences indépendantes en triplicatas. ANOVA : $P > 0.05$.

Les cellules CEV humaines du cordon ombilical (HUVEC) s'hypertrophient suite à 22 heures d'incubation avec de faibles concentrations de hox-LDL (50 µg/ml) (Seibold et al., 2004). L'absence de différence de masse mitochondriale entre les MG-63 avec hox-LDL versus le contrôles nous a menée à poser l'hypothèse que la taille cellulaire est augmentée. Un plus grand volume cellulaire pourrait expliquer l'augmentation d'activité MTT observée en présence de hox-LDL. Toutefois, aucune différence significative n'est observée à faible concentration. Seule l'incubation avec 200 µg/ml de hox-LDL provoque une diminution de la taille. Tel qu'expliqué dans l'article de notre équipe sur l'apoptose, de fortes concentrations de hox-LDL perturbent l'intégrité lysosomale et causent la mort cellulaire (Brodeur et al., 2007). Cette mort cellulaire implique une apoptose, un phénomène associé à une réduction de la taille cellulaire avec la formation de corps apoptotique (de Magalhães et Faragher, 2008).

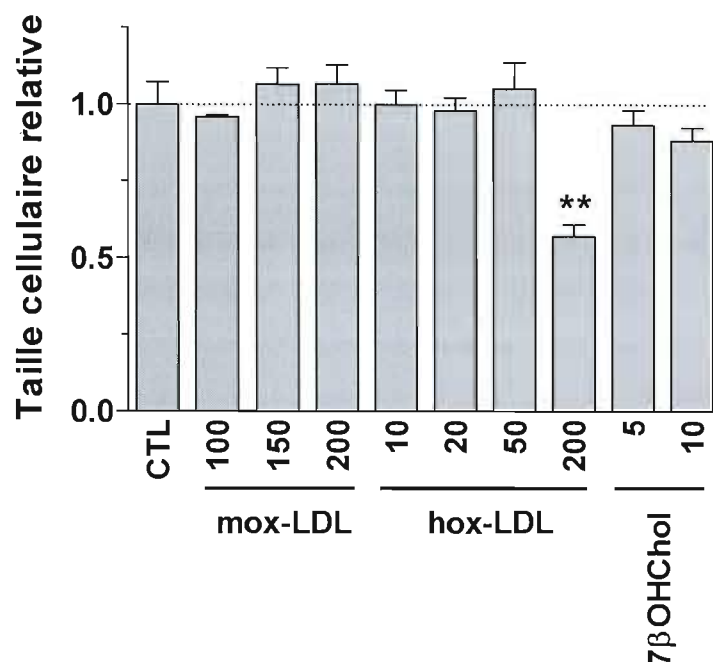


Fig. S5. **Effet de concentrations croissantes de mox-LDL, de hox-LDL et de l'oxystérol 7β-hydroxycholestérol sur la taille des cellules MG-63.** Les cellules MG-63 ont été incubées avec des oxLDL ou le 7β-hydroxycholestérol pendant 48 heures. La taille relative a été déterminée avec un cytofluoromètre et est exprimée par rapport à la valeur du CTL (milieu seul). Les données représentent la moyenne \pm SEM comparée à un CTL sans traitement (milieu DMEM/F12 seul) à partir d'au moins 3 expériences indépendantes en duplicatas. ANOVA ** $P < 0.01$, inférieur au CTL.

Dans l'optique de documenter les liens unissant la pathologie de l'athérosclérose à l'ostéoporose et d'identifier l'agent responsable de la production de ROS dans les MG-63 en présence de hox-LDL, nous avons décidé de vérifier l'expression génétique de l'ARNm du récepteur LOX-1. Nous avons posé l'hypothèse que les cellules MG-63 expriment LOX-1. Toutefois, les MG-63 n'expriment pas l'ARNm de ce récepteur (figure S6). Les contrôles positifs sont représentés par la présence d'une bande à 243 pb chez les cellules THP-1 de la lignée monocyttaire différenciées en macrophages suite à l'incubation avec 100 nM de PMA

(*phorbol myristate acetate*) pendant 48 h et des cellules JAR de la lignée trophoblastique. Le PMA agit en favorisant la phosphorylation des sérines 63 et 73 du domaine de trans-activation de c-jun, augmentant son affinité pour l'ADN et menant à la voie de différenciation des macrophages (Pulverer et al., 1993). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse qu'un autre récepteur serait impliqué dans la réponse aux hox-LDL.

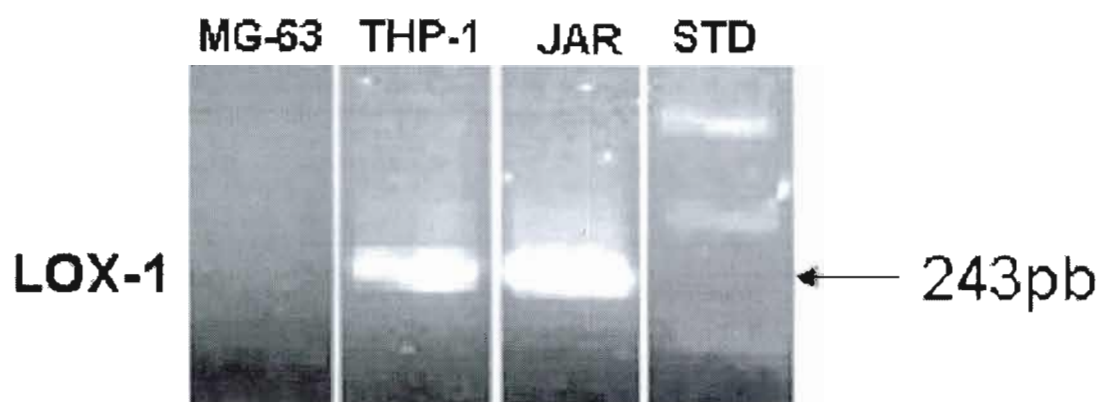


Fig. S6. Évaluation de l'expression génique de LOX-1 par les cellules MG-63. L'expression de l'ARNm du récepteur leptin-like oxidized LDL (LOX-1) a été vérifiée dans trois différentes lignées cellulaires : les cellules monocytes THP-1 différenciées en macrophages par l'incubation avec du PMA, les cellules trophoblastiques JAR et les MG-63. Seules les cellules THP-1 et JAR expriment LOX-1, identifié par la bande de 243pb correspondant au gène amplifié par RT-PCR, tel que décrit dans l'article, avec les amorces (sens, 5'- AGACTGGATCTGGCATGGAG-3'; anti-sens, 5'-TAAGTGGGGCATCATA GGA G-3') spécifiques de LOX-1.

La NADPH oxydase est reconnue jouer un rôle dans plusieurs pathologies inflammatoires dont l'athérosclérose (Arbiser et al., 2002; Chow et al., 2007; Datla et al., 2007; Guzik et al., 2000; Thum et Borlak, 2004). De plus, son expression et son activation sont stimulées par les oxLDL dans divers modèles cellulaires (O'Donnell et al., 1993; Guzik et al., 2000; Heinloth et al., 2000; Galle et al., 2001; Thum et Borlak, 2004; Chow et al., 2007). Nous avons émis

l'hypothèse que les ostéoblastes expriment une des formes de la NADPH oxydase. L'expression de NOX-4 a été confirmée par RT-PCR dans la lignée MG-63 (figure S7).

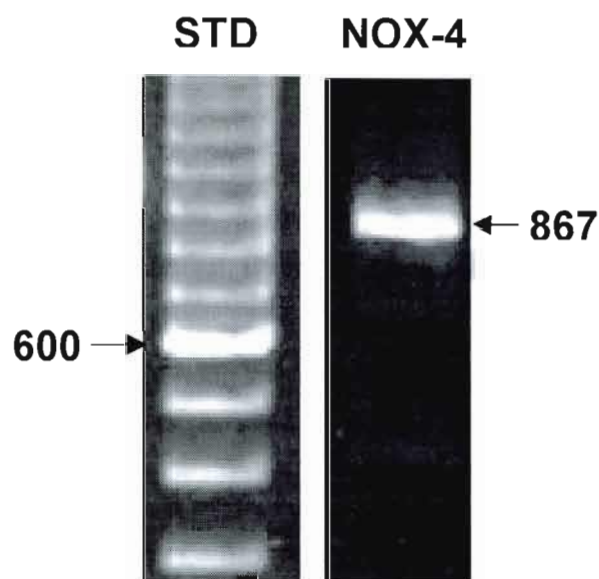


Fig. S7. **Évaluation de l'expression génique de NOX-4 par les cellules MG-63.** L'expression du récepteur NADPH oxidized-4 (NOX-4) a été vérifiée dans les cellules MG-63. Les cellules cultivées dans le DMEM/F12 expriment NOX-4, identifié par la bande de 867pb correspondant au gène amplifié par RT-PCR, tel que décrit dans l'article, avec les amorces (Sens, 5'-ACCAAGGGCCAGAGTATCAC-3'; anti-sens, 5'-ACCATTCGGATTCCA TGAC-3') spécifiques de NOX-4.

Uemura et al. (2002) démontrent que le pré-traitement avec l' α -tocophérol (vitamine E) permet de prévenir l'apoptose des VSMC induite par 50 μ M de 7ketocholestérol. Nous avons posé l'hypothèse que la vitamine E prévient la perte de viabilité de cellules ostéoblastiques observée avec le 7ketocholestérol. Conformément à la littérature, la présence de l'antioxydant vitamine E permet de rétablir l'activité MTT au niveau du contrôle correspondant (vitamine E seule) en présence de 30 μ M de 7ketocholestérol, une concentration réduisant de façon significative la viabilité cellulaire (figure S8).

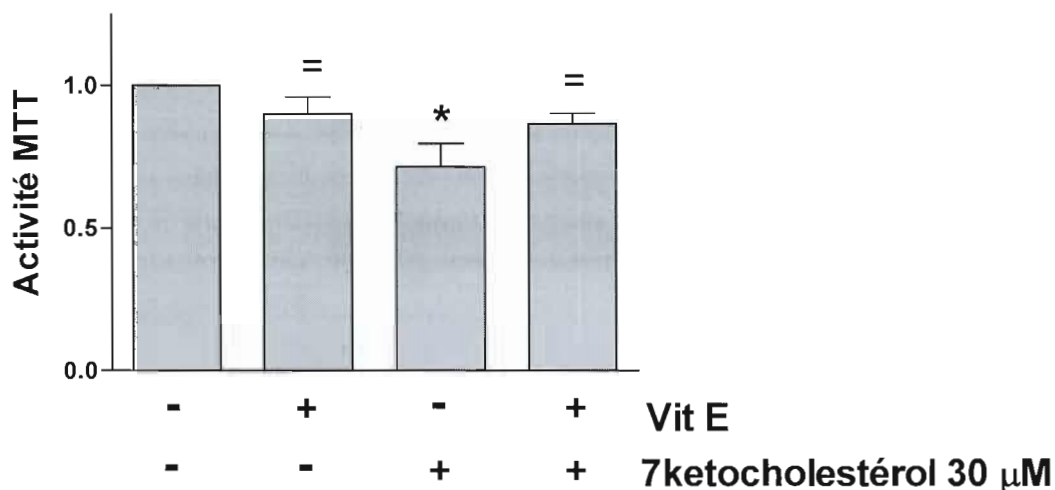


Fig. S8. Effet de la vitamine E sur l'activité MTT des cellules MG-63 en présence de 7ketocholestérol 30 μ M. Les cellules ont été incubées pendant 48 heures dans un milieu de culture sans ou avec vitamine E, et ce, en présence ou non de 7ketocholestérol 30 μ M. L'activité MTT est exprimée par rapport à la valeur du milieu seul. T test : = $P > 0.05$ pour les conditions avec vitamine E, mais $P < 0.05$ par rapport à la condition avec le milieu seul. ANOVA : * $P < 0.05$.

2.3.3. Discussion

Vérification de l'état d'oxydation des LDL

Considérant que l'effet des oxLDL sur la viabilité des cellules varie en fonction de la concentration et du degré d'oxydation des LDL, il a donc été important de mesurer régulièrement le niveau d'oxydation des lipoprotéines utilisées. La migration sur gel d'agarose des LDL utilisées dans la présente étude a permis de confirmer leur intégrité.

Il est aussi possible de mesurer le degré d'oxydation des LDL par la mesure de l'intensité et du déplacement du spectre de l'émission de fluorescence suite à une excitation à 360 nm (Esterbauer et al., 1987; Esterbauer et al., 1989). Une autre méthode intéressante du point de

vue qualitatif est l'analyse par HPLC (Esterbauer et al., 1989). Elle permet de comparer la composition lipidique des LDL natives ou oxydées à différents degrés. Cette méthode aurait ainsi permis de vérifier la présence et quantifier l'importance de produits d'oxydation, tels le 7 β -hydroxycholestérol, le 7ketoxycholestérol et la lysoPC. De plus, l'oxydation des LDL forme des aldéhydes réactifs à l'acide thiobarbiturique (TBARS) (Kontush et al., 2003). La présence de ceux-ci est traduite en équivalents de MDA par mg de LDL. Elle permet de classer les oxLDL selon leur contenu en aldéhydes: Les mox-LDL ont environ 2 à 4 nmol de MDA/mg de LDL, tandis que les nLDL n'en contiennent pas. Les hox-LDL en contiennent entre 35 et 45 nmol de MDA/mg de LDL (Yagi, 1976).

Effets des mox-LDL sur les cellules MG-63

Généralement, plus les LDL sont oxydées et plus le temps d'exposition est long, moins les cellules sont stimulées et subissent graduellement l'apoptose (Bjorkerud et Bjorkerud, 1996; Kockx et al., 1998; Claise et al., 1999; Heinloth et al., 2000; Galle et al., 2001; Takei et al., 2001; Heinloth et al., 2002; Brodeur et al., 2007). Il a été rapporté que ces particules provoquent des réponses cellulaires en accord avec le développement de l'athérosclérose, comme par exemple la prolifération des VSMC (Auge et al., 1995; Watanabe et al., 2001; Watanabe et al., 2002).

En ce sens, les mox-LDL n'induisent pas une réponse hormésique de l'activité réductrice des cellules MG-63, car il y a une stimulation de l'activité MTT sans inhibition avec l'augmentation des concentrations. De plus, de faibles concentrations de mox-LDL, qui stimulent l'activité MTT, n'augmentent pas le nombre de cellules. Ce résultat est inattendu, car à faibles concentrations, les nLDL et les hox-LDL provoquent la prolifération. Ainsi, la prolifération des VSMC (Auge et al., 1995; Watanabe et al., 2001; Watanabe et al., 2002) induite par les mox-LDL n'est pas reproduite avec notre modèle cellulaire. De plus, à l'inverse des hox-LDL, le ratio de l'activité MTT sur le nombre de cellules ne tend pas vers une valeur de un à fortes concentrations. Le maintien d'un ratio élevé et l'absence d'inhibition de l'activité MTT avec de fortes concentrations de mox-LDL est contraire aux hox-LDL. Les mox-LDL provoquent une réponse cellulaire qui exclue la prolifération et possiblement la mort cellulaire en tenant compte du nombre de cellules relativement élevé,

légèrement inférieur au contrôle à fortes concentrations, et de la très faible diminution d'activité MTT à forte concentrations. Ainsi, pour déclarer que les mox-LDL ont un effet de stimulation, elles devraient provoquer une prolifération supérieure au contrôle, ce qui n'est pas observé dans les MG-63.

Il semble alors que l'augmentation de l'activité MTT ne soit reliée qu'à une augmentation du métabolisme réducteur cellulaire. Tout comme pour les hox-LDL, cette énergie est possiblement utilisée par la cellule pour des processus de défense face à un stress oxydatif. Nous démontrons dans l'article que même s'il y a prolifération des MG-63 en présence de hox-LDL, cette stimulation est néfaste au niveau des fonctions ostéoblastiques. Ainsi, l'absence de prolifération et de corrélation entre l'activité MTT et le nombre de cellules en présence de mox-LDL suggèrent l'apparition d'un phénomène de compensation du stress oxydatif similaire à celui observé lors de l'incubation avec les hox-LDL. Ainsi, qu'il y ait ou non prolifération, la seule exposition aux oxLDL oriente l'énergie cellulaire vers des mécanismes de défense, ce qui nuit fort probablement au fonctionnement normal de la cellule.

Le degré d'oxydation est différent entre les particules d'une population de LDL *in vivo* (Kavanach et al., 2003). Ainsi, leur structure et leur composition en cétones sont variables. Leurs effets *in vivo* varient au niveau de la stimulation de la réponse inflammatoire et de l'athérogénicité (Kavanach et al., 2003). D'ailleurs, nous démontrons une différence au niveau des effets des mox-LDL et des hox-LDL sur l'activité MTT et la prolifération des cellules MG-63. Nous pourrions spéculer que l'effet des hox-LDL, qui induisent une stimulation de l'activité MTT accompagnée par une prolifération cellulaire, pourrait, davantage que les mox-LDL, être associée à la progression de l'ostéoporose *in vivo*. En effet, les mox-LDL ne provoquent pas de prolifération cellulaire, ce qui réduit le risque de perdre la différenciation et la migration ostéoblastique comme avec les hox-LDL.

Effets des constituant des oxLDL

Les constituants oxydés des particules hox-LDL sont susceptibles d'être transférés aux cellules et de provoquer les effets associés aux oxLDL. D'ailleurs, le 7 β -hydroxycholestérol

provoque un profil de stimulation de l'activité MTT similaire aux hox-LDL tandis que le 7ketocholestérol l'inhibe à fortes concentrations (article). Toutefois, la lysoPC n'altère pas l'activité MTT des MG-63. L'absence de diminution de viabilité cellulaire à fortes concentrations nous permet de poser l'hypothèse que les cellules MG-63 n'interagissent pas avec la lysoPC seule. Il serait judicieux d'effectuer des essais de liaison et de localisation cellulaire par marquage radioactif de la lysoPC incubée avec ou sans LDL afin d'évaluer cette hypothèse.

Le 7ketocholestérol est un composant cytotoxique des LDL oxydées au cuivre (Ong et al., 2003) aussi retrouvé au sein des plaques athérosclérotiques (Rodriguez et al., 2004). Nous avons démontré qu'il réduit l'activité MTT de façon dose-dépendante chez les cellules MG-63 avec une incubation de 48 heures (article). De plus nos résultats complémentaires indiquent qu'il y a rétablissement de la viabilité cellulaire par la vitamine E en présence de 7ketocholestérol, ce qui appuie l'hypothèse selon laquelle la perte d'activité MTT est en partie causée par la formation de ROS. À l'opposé, nos résultats indiquent que la production de ROS n'est pas directement responsable de l'augmentation de l'activité MTT par les oxLDL (article). Ainsi, à faible concentration, le candidat susceptible de contribuer à l'effet de stimulation des oxLDL demeure le 7 β -hydroxycholestérol

La NADPH oxydase

Nos résultats complémentaires indiquent que les cellules MG-63 expriment la flavoenzyme NOX-4. Le complexe enzymatique NADPH oxydase fait partie d'un ensemble d'enzymes appelées flavoprotéines jouant un rôle dans la détoxification, la photosynthèse, l'apoptose et le stress oxydatif (Babior, 1999; Cheng et al., 2001; Arbiser et al., 2002; Thum et Borlak, 2004). La fonction primaire de l'enzyme NADPH oxydase est la régulation de la production de ROS intra et extracellulaire (Steinbeck et al., 1993), essentielle à la destruction des agents pathogènes par les macrophages et la transduction de signaux intracellulaires (Uhlinger et al., 1992; Uhlinger et al., 1995; Finegold et al., 1996; Datla et al., 2007). Elle contient un site pyridine nucléotide composé d'un cofacteur flavine (FAD) nécessaire au transfert d'électrons du NADPH à l'oxygène (Uhlinger et al., 1995; Finegold et al., 1996; Thum et Borlak, 2004). De plus, le cœur catalytique correspond à une des variantes des protéines gp91, appelée NOX

1 à 5 (Cheng et al., 2001). Les autres composants au nombre de quatre incluent la sous-unité p67phox, p47phox, p22 et la petite GTPase Rac (Uhlinger et al., 1992; Cheng et al., 2001).

La NADPH oxydase est une enzyme membranaire responsable de l'état d'oxydoréduction cytoplasmique cellulaire (figure A13). Son activation est reconnue comme un facteur favorisant le développement de l'athérosclérose (Guzik et al., 2000; Arbiser et al., 2002; Thum et Borlak, 2004; Chow et al., 2007; Datla et al., 2007). Comme l'athérosclérose est reliée à l'ostéoporose, il est possible que l'activité de la NADPH oxydase soit impliquée dans les effets des oxLDL sur les cellules ostéoblastiques. Le niveau d'expression de l'ARNm des sous-unités gp91, p22 ainsi que NOX-4 est stimulé par les oxLDL chez les CEV (O'Donnell et al., 1993; Thum et Borlak, 2004; Chow et al., 2007), les HUVEV (Galle et al., 2001; Heinloth et al., 2000) et chez les patients CAD (Guzik et al., 2000) et corrèle avec la sévérité de l'athérosclérose et la production de ROS intracellulaire (Sorescu et al., 2002). De plus, la production de ROS par la NADPH oxydase réduit la production de NO par les cellules vasculaires (Guzik et al., 2000; Hein et al., 2000). Le NO joue un rôle important dans le métabolisme osseux en diminuant l'expression de RANKL et en augmentant OPG, réduisant les fonctions ostéoclastiques et la dégradation osseuse (Lowik et al., 1994). Ainsi, il serait intéressant de poursuivre des études afin d'évaluer l'importance de NOX-4 dans les effets induits par les oxLDL sur les cellules ostéoblastiques.

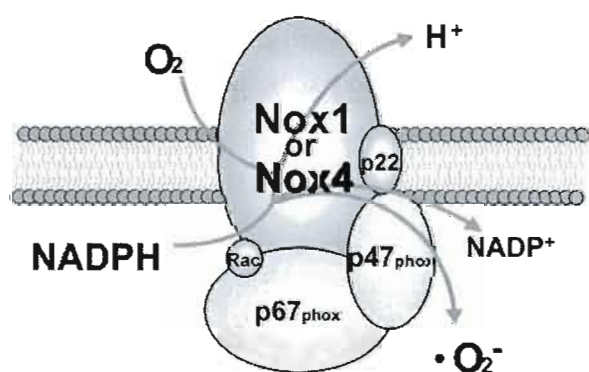


Fig. A13. **Représentation de la NADPH oxydase.** Schématisation du transfert d'électron du cofacteur NADPH au complexe flavoprotéique de la NADPH oxydase NOX-1 ou NOX-4 et à l'accepteur d'électron O_2 , générant le radical superoxyde $O_2^{\cdot -}$.

Flavoenzymes et effets des oxLDL

L'activité des flavoenzymes est connue pour être impliquée dans la réduction du MTT. Nous démontrons dans l'article l'implication des flavoenzymes dans l'activité de réduction cellulaire du MTT, accrue en présence de hox-LDL. De plus, nous mettons en évidence l'expression de l'ARNm de la flavoenzyme NOX-4 par les MG-63. Aussi, la présence de son cofacteur NADPH est augmentée en présence de hox-LDL (article). Ainsi, la NADPH oxydase-4 est un candidat potentiellement impliqué dans l'augmentation de l'activité MTT chez les MG-63 en présence des hox-LDL.

De plus, la NADPH oxydase-4 pourrait être responsable de la production de ROS en réponse à l'exposition aux hox-LDL. Plusieurs auteurs citent que la prolifération des HUVEC et des cellules stellaires hépatiques est dépendante de la production de ROS par la NADPH oxydase (Adachi et al., 2005; Galle et al., 2001; Heinloth et al., 2000; Datla et al., 2007). Toutefois, lorsque nous co-incubons NAC et hox-LDL avec les MG-63 afin de réduire les niveaux de ROS, nous ne parvenons pas à diminuer l'activité MTT. Nous pouvons en déduire que l'effet de NOX-4 sur l'activité MTT en présence de hox-LDL pourrait être causé par l'activité enzymatique réductrice en elle-même et non par la production de ROS et la prolifération qui y serait associée. Une hypothèse est que NOX-4 puisse réduire directement le MTT, au lieu de l'oxygène, et que l'augmentation de l'activité MTT provienne d'une stimulation de l'activité de NOX-4 par les oxLDL. Cette hypothèse demeure présentement non vérifiée.

Toutefois, il existe une différence significative entre l'activité MTT sans traitement (contrôle) et avec NAC (T test $P < 0,05$) (article, figure 5). Cette réduction en présence de NAC laisse supposer que les niveaux de ROS en condition basale sont partiellement impliqués dans la prolifération cellulaire, conformément à la littérature (Chow et al., 2007; Galle et al., 2001). L'incubation avec le L-buthionine-SR-sulfoximine (BSO) sans lipoprotéines augmente les niveaux cellulaires de ROS mais n'induit pas d'augmentation de l'activité MTT, ce qui exclut la seule implication des ROS.

CHAPITRE III

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Chacune des espèces de LDL induit une variété d'effets dépendant de la concentration, du temps d'exposition, du degré d'oxydation et du modèle cellulaire utilisé (Steinberg et al., 1989; Berligner et al., 1995). Les oxLDL provoquent des réponses cellulaires de stimulation à faibles concentrations et d'inhibition à fortes concentrations, qui ont été associées au développement de l'athérosclérose. Nos résultats sont en accord avec la littérature selon laquelle les LDL ont des effets divers variant selon la concentration utilisée, le temps d'incubation et le degré d'oxydation.

Tel que démontré dans l'article, la stimulation de type hormèse des ostéoblastes par les hox-LDL est néfaste au niveau des fonctions ostéoblastiques. Les cellules pré-ostéoblastiques prolifèrent à un rythme étroitement régulé afin d'assurer le renouvellement adéquat du tissu osseux. Un nombre trop faible d'ostéoblastes augmente l'activité de dégradation ostéoclastique. En plus, une altération de la division des cellules pré-ostéoblastiques, soit en l'augmentant ou en la diminuant, risque de nuire à la différenciation en ostéoblastes matures chargés de synthétiser la matrice osseuse, phénomène appuyé par la diminution de l'activité phosphatase alcaline (article) et de la migration cellulaire.

L'exposition aux oxLDL provoque une réponse de stress modifiant la capacité réductrice de la cellule avec ou sans induction de la prolifération, tel que démontré par les différents effets des mox-LDL et des hox-LDL. Nous ne sommes pas en position d'adaptation cellulaire tel que documenté pour certains types d'hormèse, mais bien de réaction de stress. La stimulation cellulaire mesurée représente plutôt une tentative d'adaptation au stress oxydatif. Toutefois, la perturbation des fonctions ostéoblastiques de prolifération, de différenciation et de migration nécessaires à la colonisation et à la régénération de la matrice osseuse par les concentrations de oxLDL utilisées démontrent que la cellule n'arrive pas à s'adapter. Ce phénomène appuie l'hypothèse selon laquelle l'énergie cellulaire est hypothéquée pour la régénération des mécanismes de défense. De plus, l'apoptose observée par notre équipe à concentrations élevées de hox-LDL (Brodeur et al., 2007) et la diminution de la viabilité des

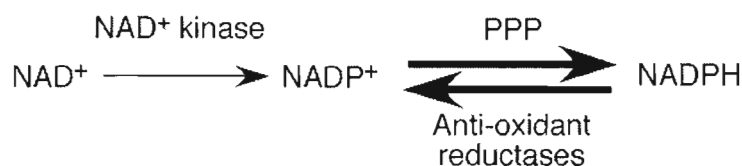
cellules avec la co-incubation BSO et oxLDL suggère que les défenses finissent par être surchargées lors de plus fortes expositions aux particules oxydées. Les LDL ont ainsi le potentiel de nuire aux fonctions de métabolisme osseux cellulaires. En modifiant le métabolisme et les fonctions cellulaires des ostéoblastes, les oxLDL risquent de perturber l'équilibre de dégradation et de synthèse de la matrice osseuse nécessaire au maintien d'un tissu de qualité (BMD, minéralisation, micro-architecture) et ainsi mener à l'ostéoporose, ce qui appuie l'existence d'un lien entre le développement de l'athérosclérose et de l'ostéoporose. Plus précisément, de fortes concentrations sériques de LDL, contribuant à générer des oxLDL, risquent de perturber le métabolisme ostéoblastique et mener à l'ostéoporose. En ce sens, tout comportement ou habitude de vie visant à réduire le niveau de LDL sanguin est souhaitable dans une optique de prévention des fractures osseuses.

Les concentrations utilisées dans cette étude peuvent se comparer avec la réalité physiologique. Il a été démontré que les patients CAD (*atherosclerosis and coronary artery disease*) avaient de 13 à 75 µg/ml de oxLDL sériques (Holvoet et al., 2000; Holvoet et al., 2007). Ainsi, les faibles concentrations de oxLDL utilisées dans la présente étude (20 µg/ml pour la majorité des expériences) se comparent à la limite inférieure d'un haut taux de cholestérol oxydés. Par ailleurs, après un repas riche en gras, de faibles concentrations de 7ketocholestérol (1,6 µg/ml) sont retrouvées dans le plasma humain. Toutefois, les concentrations augmentent dramatiquement à l'intérieur des plaques athérosclérotiques (Hodis et al., 1991; Brown et Jessup, 1999). De plus, un taux de 1000 µg/ml est considéré normal, tandis qu'il y aurait danger au-dessus de 2000 µg/ml de nLDL sérique. Nous travaillons à des niveaux de 10 à 200 fois inférieures aux concentrations sériques de nLDL considérées à risque d'athérosclérose. Toutefois, il est difficile de savoir à quelle concentration les ostéoblastes sont exposés *in vivo*. En effet, les LDL traversent une barrière constituée d'une monocouche de cellules endothéliales vasculaires (CEV) avant d'être en contact avec les ostéoblastes. En plus, un ostéoblaste vit plus longtemps que 48 heures, ce qui risque d'augmenter son exposition totale aux nLDL et aux oxLDL. Ainsi, notre modèle pourrait correspondre à une exposition aiguë des cellules aux différents types de LDL, tandis que l'exposition physiologique serait chronique. Conséquemment, il est difficile d'effectuer la transposition complète des résultats *in vitro* à la réalité *in vivo*.

Pour orienter et inspirer les recherches ultérieures dans le domaine, nous proposons le mécanisme suivant pour expliquer l'effet des oxLDL sur les cellules ostéoblastiques. Les hox-LDL et le 7 β -hydroxycholestérol stimulent directement ou indirectement l'activation de flavoenzymes, dont NOX-4, qui nécessitent le cofacteur NADPH. L'activité des NADPH oxydases génère des ROS. Après avoir épuisé le contenu cellulaire en protéines possédant des groupements thiols (GSH, métallothionéine), une sur-production de ROS est dommageable pour les membranes, les organelles et l'ADN. En effet, la co-incubation de BSO et hox-LDL induit une perte de viabilité cellulaire. Afin de maintenir un environnement cytoplasmique réduit, les cellules exposées aux hox-LDL doivent régénérer leurs mécanismes de protection. Pour ce faire, elles augmentent leur production de NADPH (article) via le cycle de Krebs et des pentoses phosphates (PPP). D'ailleurs, la production de ROS est connue pour stimuler le PPP et la NAD kinase (Gupte et al., 2006; Singh et al., 2007). La NAD kinase convertit le NAD, impliqué dans la production d'ATP, en NADP, agent contrôlant l'état d'oxydoréduction intracellulaire. L'activité de la NAD kinase et des enzymes du PPP, dont la glucose-6-phosphate déshydrogénase, génère le NADPH (figure A14). Celui-ci est nécessaire à l'activité des flavoenzymes et à la régénération des enzymes responsables de la neutralisation des ROS (catalase, superoxyde dismutase (SOD), métallothionéine et glutathion peroxydase) (Brioukhanov et Netrusov, 2006; Singh et al., 2007). Le NADPH est aussi connu pour être un facteur important dans la réduction du MTT (Berridge et Tan, 1993; Berridge et al., 2005), ce qui le positionne comme candidat susceptible de participer à la réduction du MTT dans les MG-63 en présence de hox-LDL. En effet, le MTT serait réduit principalement à l'extérieur de la mitochondrie, soit au niveau du cytoplasme, des lysosomes et de la membrane plasmique (Berridge et al., 2005). L'augmentation de l'activité MTT donne alors une fausse piste concernant la viabilité cellulaire. Ainsi, la génération de NADPH est liée au métabolisme énergétique, et tout excès de ROS perturbe l'équilibre NAD/NADP et oriente l'utilisation de l'énergie cellulaire vers la détoxification (Singh et al., 2007). Le NADPH donne donc l'impression d'une augmentation de la viabilité alors qu'il témoigne d'une réponse à un stress. Les voies servant à produire de l'énergie sont donc utilisées pour la protection contre le stress oxydatif pouvant provenir de l'activité enzymatique des flavoenzymes. Cette réorientation de l'énergie altère la migration,

la prolifération et la différenciation ostéoblastique, risquant de perturber la synthèse de la matrice osseuse et les fonctions de régulation du métabolisme osseux. De plus, la production de ROS empêche la signalisation par le NO impliquée dans l'expression d'OPG et RANKL nécessaires à la régulation de l'activité de dégradation ostéoclastique.

Cytosol



Mitochondria

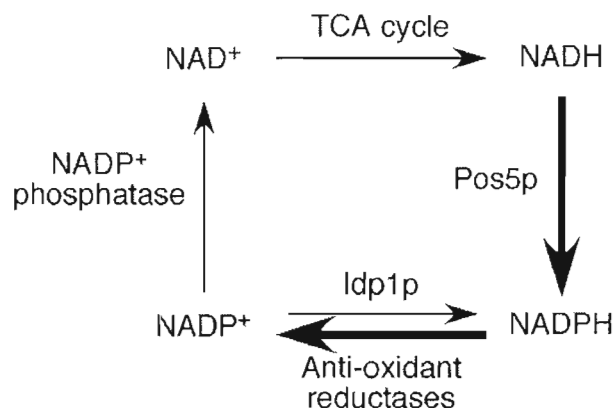


Fig. A14. **Représentation des sources cytosolique et mitochondriales du NADPH.** PPP : voie des pentoses phosphates, TCA : cycle de Krebs mitochondrial

Lors d'études futures, il serait pertinent d'évaluer l'état d'activation des enzymes du cycle de Krebs et du PPP, dont la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la NAD kinase. Aussi, il serait intéressant d'étudier l'effet des oxLDL et du 7 β -hydroxycholestérol sur le système OPG-RANKL. En effet, ces molécules sont reconnues pour jouer un rôle prépondérant dans le remodelage osseux. Leur expression varie en fonction de plusieurs facteurs, ce qui pourrait mener à l'hypothèse que les oxLDL perturbent leur équilibre, en favorisant les signaux d'activation de dégradation du tissu osseux par les ostéoclastes.

Afin de vérifier l'implication de NOX-4 dans l'activité MTT et dans la prolifération à faible concentration de oxLDL, il serait pertinent de vérifier l'état d'activation et d'expression de NOX-4 en fonction de différents traitements *in vitro* avec des lipoprotéines, en plus de réduire son expression par une approche d'interférence à l'ARN. Subséquemment, il serait intéressant d'étudier les mécanismes par lesquels les oxLDL stimulent l'activité de la NADPH oxydase. Il est possible que l'activation et l'action de la NADPH oxydase-4 des cellules ostéoblastiques des patients avec un haut taux de lipoprotéines de faibles densité oxydées est accrue, ainsi que les dommages oxydatifs et le déséquilibre des fonctions osseuses. Il serait aussi intéressant de bloquer l'expression de NOX-4 par ARN interférant et vérifier s'il est ainsi possible de prévenir l'apoptose à fortes concentrations de oxLDL. Dans le cas où NOX-4 démontre être impliqué dans l'effet des oxLDL, nous aimerions continuer les études *in vivo*. Conséquemment, nous pourrions nourrir des souris avec une diète riche en gras favorisant l'athérosclérose et étudier par immunohistochimie l'expression de NOX-4 dans l'os.

Notre étude, se concentrant sur la portion de stimulation du profil hormésique, apporte une critique de la méthode de réduction du MTT comme outils d'évaluation de la viabilité cellulaire. L'interprétation des mesures de viabilité cellulaire induites par des agents pathologiques comme les oxLDL doit être appuyée par des essais supplémentaires, tels que démontré dans le mémoire et l'article. L'évaluation plus juste de l'intégrité cellulaire permet d'associer plus efficacement les réponses *in vitro* aux conditions physiologiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem.* 55:287-299, 1994
- Abate N, Garg A, Enas EA. Citation Physico-chemical properties of low density lipoproteins in normolipidemic Asian Indian men. *Horm Metab Res.* 27:326-31, 1995
- Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science.* 271:518-520, 1996
- Acton SL, Scherer PE, Lodish HF, Krieger M. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor *J Biol Chem.* 269:21003-21009, 1994
- Adami S, Braga V, Zamboni M, Gatti D, Rossini M, Bakri J, Battaglia E. Relationship between lipids and bone mass in 2 cohorts of healthy women and men. *Calcif Tissue Int.* 74:136-142, 2004.
- Adachi T, Togashi H, Suzuki A, Kasai S, Ito J, Sugahara K, Kawata S. NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology.* 1:1272-81, 2005
- Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé. L'ostéoporose chez les femmes ménopausées et chez les sujets traités par corticoïdes : méthodes diagnostiques et indications. Recommandations pour la pratique clinique. ANAES, 2001.
- Anderson HC. Matrix vesicles and calcification. *Current Rheumatol Rep.* 5:222-226, 2003
- Arbiser JL, Petros J, Klafter R, Govindajaran B, McLaughlin ER, Brown LF, Cohen C, Moses M, Kilroy S, Arnold RS, Lambeth JD. Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci.* 99:715-720, 2002
- Auge N, Pieraggi MT, Thiers JC. Proliferation and cytotoxic effects of mildly oxidized low-density lipoproteins on vascular smooth-muscle cells. *Biochem J.* 309:1015-1020, 1999
- Aviram M, Rosenblat M. Macrophage-mediated oxidation of extracellular low density lipoprotein requires an initial binding of the lipoprotein to its receptor. *J Lipid Research.* 35:385-398, 1994
- Babior BM, NADPH oxidase : an update. *Blood.* 93:1464-1476, 1999
- Banks LM, Lees B, MacSweeney JE, Stevenson JC. Effect of degenerative spinal and aortic calcification on bone density measurements in post-menopausal women: links between osteoporosis and cardiovascular disease? *Eur J Clin Invest.* 24:813-817, 1994

- Barengolts EI, Berman M, Kukreja SC, Kouznetsova T, Lin C, Chomka EV. Osteoporosis and coronary atherosclerosis in asymptomatic postmenopausal women. *Calcif Tissue Int.* 62:209-213, 1998.
- Baron R, Neff L, Roy C, Boisvert A, Caplan M. Evidence for a high and specific concentration of (Na⁺, K⁺) ATPase in the plasma membrane of the osteoclast. *Cell.* 46:311-320, 1986
- Basu SK, Goldstein JL, Brown MS. Characterization of the low density lipoprotein receptor in membranes prepared from human fibroblasts *J Biol Chem.* 253:3852-3856, 1978
- Beaudoin C, Fardellone P, Thelot B, Juvin R, Potard V, Bean K, Sebert JL. Hip fractures in France: the magnitude and perspective of the problem. *Osteoporos Int.* 6:1-10, 1996
- Bellido T. Osteocyte control bone formation via Sost/sclerostin. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 6:360-363, 2006
- Berliner JA, Navab MM, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation.* 1;91:2488-96, 1995
- Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys.* 303:474-482, 1993
- Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 11:127-152, 2005
- Bittner V. Atherosclerosis and the immune system. *Arch Intern Med.* 158:1395-1396, 1998
- Bjorkerud B, Bjorkerud S. Contrary effects of lightly and strongly oxidized LDL with potent promotion of growth versus apoptosis on arterial smooth muscle cells, macrophages, and fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16:416-424, 1996.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 423:337-342, 2003
- Brioukhanov AL, Netrusov AI. Catalase and superoxide dismutase: distribution, properties, and physiological role in cells of strict anaerobes. *Biochemistry.* 69:949-962, 2004
- Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 34-47, 1986
- Brown MS, Goldstein JL. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science.* 150-154, 1976

Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science*. 212:628-635, 1981

Burgeson RE, Nimni ME. Collagen types: molecular structure and tissue distribution. *Clin Orthop*. 282:250-272, 1991

Calabrese EJ, Baldwin LA. Defining hormesis. *Hum Exp Toxicol*. 21:91-97, 2002.

Calabrese EJ, Blain R. The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. *Toxicol Appl Pharmacol*. 202:289-301, 2005

Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Growth factors and the regulation of bone remodelling. *J Clin Invest*. 81:277-281, 1988

Cauley JA, Gutai JP, Sandler RB, LaPorte RE, Kuller LH, Sashin D. The relationship of endogenous estrogen to bone density and bone area in normal postmenopausal women. *Am J Epidemiol*. 124:752-761, 1986.

Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox 3, Nox4, and Nox5. *Gene*. 269:131-140, 2001

Chen TG, Chen TL, Chang HC, Tai YT, Cherng YG, Chang YT, Chen RM. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptotic insults to mouse cerebral endothelial cells via a Bax-mitochondria-caspase protease pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*. 219:42-53, 2007

Chow SE, Hshu YC, Wang JS, Chen JK. Resveratrol attenuates oxLDL-stimulated NADPH oxidase activity and protects endothelial cells from oxidative functional damages. *J Appl Physiol*. 102:1520-1527, 2007

Claise C, Edeas M, Chaouchi N, Chalas J, Liliane Capel, Sendil Oxidized-LDL induce apoptosis in HUVEC but not in the endothelial cell line EA.hy 926. *Atherosclerosis*. 147:95-104, 1999

Colles SM, Maxson JM, Carlson SG, Chisolm GM. Oxidized LDL-induced injury and apoptosis in atherosclerosis. Potential roles for oxysterols. *Trends Cardiovasc Med*. 11:131-138, 2001

Cooper GM. *La cellule. Une approche moléculaire*. Éd De Boeck Univ, 1999

Crisby M, Kallin B, Thyberg J, Zhivotovsky B, Orrenius S, Kostulas V, Nilsson J. Cell death in human atherosclerotic plaques involves both oncosis and apoptosis. *Atherosclerosis*. 130:17-27, 1997

Cummings SR, Melton III LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet*. 359:1761-1767, 2002

Currey JD. Bones: structure and mechanics. Princeton Univ Pr, 2002

Dass, Contreras, Choongé. A novel orthotopic murine model provides insights into cellular and molecular characteristics contributing to human osteosarcoma. 23:367-380, 2006

Datla SR, Peshavariya H, Dusting GJ, Mahadev K, Goldstein BJ, Jiang F. Important role of Nox4 type NADPH oxidase in angiogenic responses in human microvascular endothelial cells in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27:2319-24, 2007

Davi G, Patrono C. Platelet Activation and Atherothrombosis. *N Engl J Med.* 357: 2482-2494, 2007.

Davidsohn I, Henry JB. Clinical diagnosis by laboratory methods. 15th Edition. Todd-Sanfrd. W.B. Saunders Co. 639, 1974

Delmas PD. Hormone replacement therapy in the prevention and treatment of osteoporosis. *J Osteoporosis Int.* 7:3-7, 2005

de Magalhães JP, Faragher RG. Cell divisions and mammalian aging: integrative biology insights from genes that regulate longevity. *Bioessays.* 30:567-78, 2008

Demer LL, Tintut Y. A matter of degree: a commentary on Influence of oxidized low-density lipoproteins (LDL) on the viability of osteoblastic cells. *Free Radic Biol Med.* 15;44:504-5. 2008

Dentelli P, Rosso A, Zeoli A, Gambino R, Pegoraro L, Pagano G, Falcioni R, Brizzi MF. Oxidative stress-mediated mesangial cell proliferation requires RAC-1/reactive oxygen species production and beta4 integrin expression. *J Biol Chem.* 282:26101-10, 2007

Dhaliwal BS, Steinbrecher UP. Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. *Clinica Chimica Acta.* 286:1, 1999

Dijke PT, Fu J, Schaap P et Roelen BAJ. Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation. *J Bone Joint Surg Am.* 85:34-38, 2003

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V. *Osf2/Cbfa1*: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89: 747-754, 1997

Duerrschmidt N, Zabirnyk O, Nowicki M, Ricken A, Hmeidan FA, Blumenauer V, Borlak J, Spanel-Borowski K. LOX-1 receptor mediated autophagy in human granulosa cells as an alternative of programmed cell death. *Endocrinology.* 147:3851–3860, 2006

Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *Biol Chem.* 268:11811-11816, 1993

Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Striegl G, Jurgens G. Structural, and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Am Chem Soc Chem Res Toxicol.* 3:77-92, 1990

Esterbauer H, Jurgens G, Quehenberger O, Koller E. Autoxidation of human low density lipoprotein: Loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J Lipid Res.* 28:495-509, 1987

Esterbauer H, Zollner H, Schaur RJ. Aldehydes formed by lipid peroxidation: Mechanism of formation, occurrence and determination. *Membrane Lipid Oxidation.* Vigo-Pelfrey. C Ed 1:239-268, 1989

Felix R, Cecchini MG, Fleisch H. Macrophage colony stimulating factor restores in vivo bone resorption in the op/op osteopetrotic mouse. *Endocrinology.* 127:2592-2594, 1990

Finegold AA, Shatwell KP, Segal AW, Klausner RD, Dancis A. Intramembrane bis-heme motif for transmembrane electron transport conserved in yeast iron reductase and the human NADPH Oxidase. *J Biol Chem.* 271:31021-31024, 1996

Fleisch H. Bisphosphonates in Bone Disease. The Parth Pub Gr, 1997

Fluiter K, van Berkel TJ. Scavenger receptor B1 (SR-B1) substrates inhibit the selective uptake of high-density-lipoprotein cholesteryl esters by rat parenchymal liver cells. *Biochem J.* 326:515-9, 1997

Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* 59:221-6, 1977

Folcik VA, Nivar-Aristy RA, Krajewski LP, Cathcart MK. Lipoxygenase contributes to the oxidation of lipids in human atherosclerotic plaques. *Clin. Invest.* 96:504-510, 1995

Fong LG, Parthasarathy S, Witztum JL, Steinberg D. Nonenzymatic oxidative cleavage of peptide bonds in apoprotein B-100. *28:1466-77,* 1987

Freeman MW. Scavenger receptors in atherosclerosis. *Curr Opin Hematol.* 4:41-7, 1997

Galle J, Heinloth A, Wanner C, Heermeier K. Dual effect of oxidized LDL on cell cycle in human endothelial cells through oxidative stress. *Kidney Int Supp.* 78:S120-3, 2001

Ghezzi P. Oxidoreduction of protein thiols in redox regulation. *Biochem Soc Trans.* 33:1378-81, 2005

Girasole G, Jilka RL, Passeri G. 17 β -estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest.* 89:883-891, 1992.

- Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill. 1981-2030, 1995
- Grant, Reid, Blake. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I $\alpha 1$ gene. *Nature genetics*. 14:203-205, 1996
- Gupte SA, Okada T, McMurtry IF, Oka M. Role of pentose phosphate pathway-derived NADPH in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Pulmon Pharmacol Therap*. 19:303-309, 2006
- Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res*. 86:E85-90, 2000
- Harris-Hooker S, Sanford GL, Montgomery V, Rivers R, Emmett N. Influence of low density lipoproteins on vascular smooth muscle cell growth and motility: modulation by extracellular matrix. *Cell Biol Int Rep*. 16:433-50, 1992
- Hassan MQ, Javed A, Morasso MI, Karlin J, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein GS, Stein JL, Lian JB. Dlx3 transcriptional regulation of osteoblast differentiation: temporal recruitment of Msx2, Dlx3, and Dlx5 homeodomain proteins to chromatin of the osteocalcin gene. *Mol Cell Biol*. 24:9248-9261, 2004
- Hattar S, Berdal A, Asselin A, Loty S, Greenspan DC, Sautier JM. Behaviour of moderately differentiated osteoblast-like cells cultured in contact with bioactive glasses. 4, 2002
- Heaney RP, Recker RR, Saville PD. Menopausal changes in calcium balance performance. *J Lab Clin Med*. 92:964-970, 1978
- Hein TW, Liao JC, Kuo L. oxLDL specifically impairs endothelium-dependent, NO-mediated dilation of coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 278:H175-H183, 2000
- Heinloth A, Fischer B, Brüne B, Galle J. Nitric Oxide prevents oxidized LDL-induced p53 accumulation, cytochrome c translocation, and apoptosis in macrophages via guanylate cyclase stimulation. *Atherosclerosis*. 162:93-101, 2002
- Heinloth A, Heermeier K, Raff U, Wanner C, Galle J. Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 11:1819-1825, 2000
- Holvoet P, Jenny NS, Schreiner PJ, Tracy RP, Jacobs DR. The relationship between oxidized LDL and other cardiovascular risk factors and subclinical CVD in different ethnic groups: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis*. 194:245-252, 2007

- Holvoet P, Van Cleemput J, Collen D, Vanhaecke J. Oxidized low density lipoprotein is a prognostic marker of transplant-associated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:698-702, 2000
- Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. Interactions of plasma lipoproteins with endothelial cells. *Ann NY Acad Sci.* 401:102–116, 1982
- Hessler JR, Morel DW, Lewis LJ, Chisolm GM. Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity. *Arteriosclerosis.* 3:215-222, 1983
- Hessler JR, Robertson AL, Chisolm GM. LDL-induced cytotoxicity and its inhibition by HDL in human vascular smooth muscle and endothelial cells in culture. *Atherosclerosis.* 32:213–229, 1979
- Hill TP, Spater D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. Canonical Wnt/ β -catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Develop Cell.* 8:727-738, 2005
- Hodis HN, Crawford DW, Sevanian A. Cholesterol feeding increases plasma and aortic tissue cholesterol oxide levels in parallel: further evidence for the role of cholesterol oxidation in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 89:117-126, 1991
- Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem.* 264:13963-13966, 1989
- Hooker-Harris S, Sanford GL, Montgomery V, Rivers R, Emmett N. Influence of low density lipoproteins on vascular smooth muscle cell growth and motility: Modulation by extracellular matrix. *Cell Biol. Int Reports.* 16:433-450, 1992
- Hosking D, Chilvers CED, Christiansen C. Prevention of bone loss with alendronate in postmenopausal women under 60 years of age. *N Engl J Med.* 338:485-92, 1998.
- Hu H, Hilton MJ, Tu X, Yu K, Ornitz DM, Fanxin. Long Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development *Development.* 132:49-60, 2005
- Huang F, Subbaiah PV, Holian O, Zhang J, Johnson A, Gertzberg N, Lum H. Lysophosphatidylcholine increases endothelial permeability: role of PKC and RhoA cross talk. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 289:L176–L185, 2005
- Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol.* 145:3297-3303, 1990
- Jie KG, Bots ML, Vermeer C, Witteman JC, Grobbee DE. Vitamin K status and bone mass in women with and without aortic atherosclerosis: a population-based study. *Calcif Tissue Int.* 59:352–356, 1996.
- Johnell O. The socioeconomic burden of fractures: today and in the 21st century. *Am J Med* 20:6, 2001

Jones DP, Go YM, Anderson CL, Ziegler TR, Kinkade JM, Kirlin WG. Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling and control. *FASEB J.* 18:1246-1248, 2004

Jones G, Hogan DB, Yendt E, Hanley DA. Prevention and management of osteoporosis: consensus statements from the scientific advisory board of the osteoporosis society of Canada. 155: 955-961, 1996

Kameda Takashi, Hiroshi Mano, Tatsuhisa Yuasa, Yoshihisa Mori, Koshi Miyazawa, Miho Kameda, T. Judd J, Rifkin B, Auszmann J, Oursler MJ. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J Exp Med.* 186:489-495, 1997

Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assesment of fracture risk. *Lancet.* 359:1929-36, 2002

Kavanach IC, Symes CE, Renaudin P, Nova E, Mesa MD, Boukouvalas G, Leake DS, Yaqoob P. Degree of oxidation of low density lipoprotein affects expression of CD36 and PPAR γ , but not cytokine production, by human monocyte-macrophages. *Atherosclerosis.* 168:271-282, 2003

Khosla S. Does teriparatide given in combination with menopausal hormone replacement therapy improve bone mineral density? 2:430-43, 2006

Kim HM, Himeno T, Kawashita M, Kokubo T, Nakamura T. The mechanism of biomineralization of bone-like apatite on synthetic hydroxyapatite: an in vitro assessment. *J R Soc Interface.* 1:17-22, 2004

Kockx MM, De Meyer GRY, Muhring J, Jacob W, Bult H, Herman AG. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation.* 97:2307-2315, 1998

Kontush A, Chancharme L, Escargueil-Blac I, Therond P, Salvayre R, Negre-Salvayre A, Chapman MJ. Mildly oxidized LDL particle subspecies are distinct in their capacity to induce apoptosis in endothelial cells: role of lipid hydroperoxides. *FASEB J.* 17:88-90, 2003

Korporaal SJA, Van Eck M, Adelmeijer J, Ijsseldijk M, Out R, Lisman T, Lenting PJ, Van Berkel TJC, Akkerman JWN. Platelet Activation by Oxidized Low Density Lipoprotein Is Mediated by Cd36 and Scavenger Receptor-A *Arterioscler. Thromb Vasc Biol.* 27:2476 – 2483, 2007

Kosugi K, Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM. Toxicity of oxidized low-density lipoprotein to cultured fibroblasts is selective for S phase of the cell cycle. *J Cell Physiol.* 130:311-320, 1987

Kremer M, Judd J, Rifkin B, Auszmann J, Oursler M. Estrogen modulation of osteoclast lysosomal enzyme secretion. *J Cell Biochem.* 57:271-279, 1995

Kusuhara M, Chait A, Cader A, Berck BC. Oxidized LDL stimulates mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17:141–148, 1997.

Landar A, Zmijewski JW, Dickinson DA, Le Goffe C, Johnson MS, Milne GL, Zanoni G, Vidari G, Morrow JD et Darley-Usmar VM. Interaction of electrophilic lipid oxidation products with mitochondria in endothelial cells and formation of reactive oxygen species. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290:H1777- H1787, 2006

Landis WJ. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. *Bone.* 16:533-544, 1995

Lemaire-Ewing S, Prunet C, Montange T, Vejux A, Berthier A, Bessède G, Corcos L, Gambert P, Néel D, Lizard G. Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. *Cell Biol Toxicol.* 21:97-114, 2005

Li D, Mehta JL. Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells: Evidence from use of antisense LOX-1 mRNA and chemical inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:1116-22, 2000

Liu H, Yuan L, Xu S, Wang K, Zhang T. Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol inhibits osteoblastic differentiation and promotes apoptosis of rat bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem.* 96:198-208, 2005

Lizard G, Moisan M, Cordelet C, Monier S, Gambert G, Lagrost L. Induction of similar features of apoptosis in human and bovine vascular endothelial cells treated by 7-ketocholesterol. *J Pathol.* 183:330-338, 1997

Lowik C, Nibberin PH, van de Ruit M, Papapoulos SE. Inducible production of nitric oxide in osteoblast-like cells and in fetal mouse bone explants is associated with suppression of osteoclastic bone resorption. *J Clin Invest.* 93:1465–1472, 1994

Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, Polidori MC, Catani M, Moecocchi P, Senin U, Pacifici R, Cherubini A. Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1523-1527, 2003

Marieb E. Anatomie et physiologie humaines. 2e éd. ERPI, 1999

Martin TJ, Ng KW, Suda T. Bone cell physiology. *Endocr Metab Clin North Am.* 18:833-859, 1989

Mayorga LS, Bertini F, Stahl PD. Fusion of newly formed phagosomes with endosomes in intact cells and in a cell-free system. *J Biol Chem.* 266:6511-6517, 1991

McFarlane SI, Muniyappa R, Shin JJ, Bahtiyar G, Sowers JR. Osteoporosis and cardiovascular disease: brittle bones and boded arteries, is there a link? *Endocrinology*. 23:1-10, 2004

McSheehy PMJ, Chambers TJ. Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology*. 118:824-828, 1986

Melton LJ, Atkinson EJ, O'Connor MK. Bone density and fracture risk in men. *J Bone Miner Res*. 13:1915, 1998

Melton LJ, Chrischilles EA, Cooper C. Perspective. How many women have osteoporosis? *J Bone Miner Res*. 7:1005, 1992

Meraji S, Moore CE, Skinner VO, Bruckdorfer KR. The importance of oxidation or glycosylation of low-density lipoproteins in relation to platelet activation *Platelets*. 3:155-162, 1992

Mingyi C, Tomoh M, Tatsuya S. LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol Ther*. 95:89-100, 2002

Miyauchi A, Alvarez J, Greenfield EM, Teti A, Grano M, Colucci S. Recognition of osteopontin and related peptides by an alpha v beta 3 integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. *J Biol Chem*. 266:20369-20374, 1991

Mohan SM, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop*. 263:30-48, 1991

Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis*. 4:357-364, 1984

Morel DW, DiCorleto PE. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis*. 4:357-364, 1984

Morrison, Tokita. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*. 367: 284-287, 1994

Müller K, Carpenter KL, Freeman MA, Mitchinson MJ. Antioxidant BO-653 and human macrophage-mediated LDL oxidation. *Free Radic Res*. 30:59-71, 1999

Müller K, Carpenter KL, Mitchinson MJ. Cell-mediated oxidation of LDL: comparison of different cell types of the atherosclerotic lesion. *Free Radic Res*. 29:207-20, 1998

Munger RG, Cerhan JR, Chiu BC. Prospective study of dietary protein intake and risk of hip fracture in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 69:147-52, 1999

- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, Crombrughe B. The Novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation cell. 108:17-29, 2002
- Napoli C, Quehenberger O, De Nigris F, Abete P, Glass CK, Palinski W. Mildly oxidized low density lipoprotein activates multiple apoptotic signaling pathways in human coronary cells. *FASEB J.* 14, 2000
- Nègre-Salvayre A, Mabile L, Delchambre J, Salvayre R. α -tocopherol, ascorbic acid, and rutin inhibit synergistically the copper-promoted LDL oxidation and the cytotoxicity of oxidized LDL to cultured endothelial cells. *Biol Trace Elem Res.* 47, 1995
- NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis. *JAMA.* 285:785-95, 2001
- Nishio E, Watanabe Y. Oxysterols induced apoptosis in cultured smooth muscle cells through CPP32 protease activation and bcl-2 protein downregulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 226:928-934, 1996
- O'Donnell VB, Tew DG, Jones OT, England PJ. Studies on the inhibitory effect of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem J.* 290:41-49, 1993
- Olkkonen VM, Lehto M. Oxysterols and oxysterol binding proteins: role in lipid metabolism and atherosclerosis. *Ann Med.* 36:562-72, 2004
- Ong JM, Aoki AM, Seigel GM. Oxysterol-induced toxicity in R28 and ARPE-19 cells. *Neurochem Res.* 28:883-891, 2003
- Orozco P. Atherogenic lipid profile and elevated lipoprotein (a) are associated with lower bone mineral density in early postmenopausal overweight women. *Eur J Epidemiol* 19:1105-1112, 2004
- Owen TA, Bortell R, Yocum SA. Coordinate occupancy of AP-1 sites in the vitamin D responsive and CCAAT box elements by fos-jun in the osteocalcin gene: a model for phenotype suppression of transcription. *Proc Natl Acad Sci.* 87:9990-9994, 1990
- Paredes R, Arriagada G, Cruzat F, Villagra A, Zaidi K, van Wijnen A, Lian JB, Stein S, Stein JL, Montecino M. Bone-Specific Transcription Factor Runx2 Interacts with the 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 Receptor To Up-Regulate Rat Osteocalcin Gene Expression in Osteoblastic Cells. 24:8847-8861, 2004
- Parhami F, Jackson SM, Tintut Y, Le V, Balucan JP, Territo M, Demer LL. Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells. *J Bone Miner Res.* 14:2067-2078, 1999

Parhami F, Morrow AD, Balucan JP, Leitinger N, Watson AD, Tintut Y, Berlinger JA, Demer LL. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17:680-687, 1997.

Parhami F, Tintut Y, Beamer WG, Gharavi N, Goodman W, Demer LL. Atherogenic high-fat diet reduces bone mineralization in mice. *J Bone Miner Res* 16:182-188, 2001

Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V. NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol Cell Biol.* 24:10703-10717, 2004

Pittenger EV, Mackay MF, Beck AM, Jaiswal SC, Douglas RK; Mosca R, Moorman JD, Simonetti MA, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284:143-7, 1999

Poli A, Bruschi F, Cesana B, Rossi M, Paoletti R, Crosignani PG. Plasma low-density lipoprotein cholesterol and bone mass densitometry in postmenopausal women. *Obstet Gynecol.* 102:922-926, 2003

Pulverer BJ, Hughes K, Franklin CC, Kraft AS, Leever SJ, Woodgett JR. Co-purification of mitogen-activated protein kinases with phorbol ester-induced C-jun kinase activity in U937 leukaemic cells. *Oncogene.* 8:407-415, 1993

Quinn MT, Parthasarathy S, Steinberg D. Endothelial Cell-Derived Chemotactic Activity for Mouse Peritoneal Macrophages and the Effects of Modified Forms of Low Density Lipoprotein. 82:5949-5953, 1985

Rao GN, Bradford CB. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circulation.* 70:593-599, 1992

Ramprasad MP, Fisher W, Witztum JL, Sambrano GR, Quehenberger O Steinberg D. The 94- to 97-kDa Mouse Macrophage Membrane Protein that Recognizes Oxidized Low Density Lipoprotein and Phosphatidylserine-Rich Liposomes is Identical to Macrosialin, the Mouse Homologue of Human CD68. *Proc Natl Acad Sc.* 92:9580-9584, 1995

Raven P, Neugebauer G, Christiansen C. Association between pharmacokinetics of oral ibandronate and clinical response in bone mass and bone turnover in women with postmenopausal osteoporosis. *Bone.* 30:320-324, 2002

Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth-factor induced membrane ruffling. *Cell.* 70:401-410, 1992

Rodriguez IR, Alam S, Lee JW. Cytotoxicity of oxidized low-density lipoprotein in cultured RPE cells is dependent on the formation of 7-ketocholesterol. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45:2830-7, 2004

Ross R. Mechanisms of disease: Atherosclerosis—An inflammatory disease. *N Engl J Med*. 340:115–126, 1999

Ryan L, O'Callaghan YC, O'Brien NM. Generation of an oxidative stress precedes caspase activation during 7 α -hydroxycholesterol-induced apoptosis in U937 cells. *J Biochem Mol Toxicol*. 18:50–59, 2004

Sahota O. Osteoporosis and the role of vitamin D and calcium-vitamin D deficiency, vitamin D insufficiency and vitamin D sufficiency. *Age Ageing*. 29:301–4, 2000

Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T. 17 β -Estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor- α . *Endocrinology*. 142:2205–2212, 2001

Salamone LM, Cauley JA, Black DM. Effect of a lifestyle intervention on bone mineral density in premenopausal women: a randomized trial. *Am J Clin Nutr*. 70:97–103, 1999

Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Morisaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katura Y, Kita T, Masaki T. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoproteins. *Nature*. 386:73–77, 1997.

Schmid SL. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem*. 66:511–548, 1997

Seibold S, Schurle D, Heinloth A, Wolf G, Wagner M, Galle J. Oxidized LDL induces proliferation and hypertrophy in human umbilical vein endothelial cells via regulation of p27Kip1 expression: role of RhoA. *J Am Soc Nephrol*. 15:3026–3034, 2004

Shiokawa, Yukiya Nakamaru, Emi Hiroi, Kenji Hiura, Akira Kameda, Na N Yang, Yoshiyuki Hakeda, Masayoshi Kumegawa. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J Exp Med*. 186:489–495, 1997

Siess W, Zangl KJ, Essler M, Bauer M, Brandl R, Corrinth C, Bittman R, Tigyi G, Aepfelbacher M. Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci*. 96:6931–6936, 1999

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR. Osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 89:309–319, 1997

Singh R, Mailloux RJ, Puiseux-Dao S, Appanna VD. Oxidative stress evokes a metabolic adaptation that favors increased nadph synthesis and decreased nadh production in *pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriology*. 189:6665–6675, 2007

Sinnott, Syed, Sevrakov, Barengolts. Coronary Calcification and Osteoporosis in Men and Postmenopausal Women are independent processes associated with aging. *Calcif Tissue Int.* 78:195-202, 2006

Sorescu D, Weiss D, Lassègue B, Clempus RE, Szöcs K, Sorescu GP, Valppu L, Quinn MT, Lambeth JD, Vega JD, Taylor WR, Griendling KK. Superoxide production and expression of NOX family proteins in human atherosclerosis. *Circulation.* 105:1429-35, 2002

Steinbeck MJ, Khan AU, Karnovsky MJ. Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9,10-diphenylanthracene and perylene in a polystyrene film. *J Biol Chem.* 268:15649-15654, 1993

Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem.* 272:20963-20966, 1997

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. modifications of LDL that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.* 320:915-924, 1989

Steinbrecher UP. Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochem. Biophys Acta.* 1436:279-98, 1999

Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *81:3883-3887, 1984*

Steiniche T, Hasling C, Charles P, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. A randomized study on the effects of estrogen, gestagen or high-dose oral calcium on trabecular bone remodeling in postmenopausal osteoporosis. *Bone.* 10:313-320, 1989

Stiko-Rahm A, Hultgardh-Nilsson A, Regnstrom J. Native and oxidized LDL enhances production of PDGF AA and the surface expression of PDGF receptors in cultured human smooth muscle cells. *Arterioscler Throm.* 12:1099-1109, 1992

Stout, SD, Brunsden B, Hildebolt C, Commean P, Smith K, Tappen NC. Computer assisted 3d reconstruction of serial sections of cortical bone to determine the 3d structure of osteons. *Calcified Tissue International.* 65:280-284, 1999

Subroto C, Ghosh N. Oxidized low density lipoprotein stimulates aortic smooth muscle cell proliferation. *Glycobiology.* 6:303-311, 1996

Sunyer T, Lewis J, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Estrogen's Bone-Protective Effects May Involve Differential IL-1 Receptor Regulation in Human Osteoclast-like Cells. *J Clin Invest.* 103:1409-18, 1999

- Takei A, Huang Y, Lopes-Virella M.F. Expression of adhesion molecules by human endothelial cells exposed to oxidized low density lipoprotein: Influences of degree of oxidation and location of oxidized LDL. *Atherosclerosis*. 154:79-86, 2001
- Takeshita S, Inoue N, Gao D, Rikitake Y, Kawashima S, Tawa R, Sakurai H, Yokoyama M. Lysophosphatidylcholine enhances superoxide anions production via endothelial NADH/NADPH oxidase. *J Atheroscler Thromb*. 7:238-246, 2000.
- Tall AR. An overview of reverse cholesterol transport. *Eur Heart J*. 19:A31-5, 1998
- Teitelbaum SL, Ross FP. 2003. Genetic regulation of osteoclast development. *Nat Rev Genet*. 4:638-49, 2003
- Thum T, Borlak J. Mechanistic role of cytochrome P450 monooxygenases in oxidized low-density lipoprotein-induced vascular injury: therapy through LOX-1 receptor antagonism? *Circ Res*. 94:e1-13, 2004
- Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, Noble BS. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J Clin Endocrinol Metab*. 82:3128-3135, 1997
- Uemura M, Manabe H, Yoshida N, Fujita N, Ochiai J, Matsumoto N, Takagi T, Naito Y, Yoshikawa T. α -Tocopherol prevents apoptosis of vascular endothelial cells via a mechanism exceeding that of mere antioxidation. *Eur J Pharmacol*. 456:29-37, 2002
- Uhlinger DJ, Tyagi SR, Lambeth JD. On the mechanism of inhibition of the neutrophil respiratory burst oxidase by a peptide from the C-terminus of the large subunit of cytochrome b558. *Biochemistry*. 34:524-527, 1995
- Uhlinger, DJ, Tyagi SR, Inge KL, Lambeth JD. Guanine nucleotides regulate the assembly of the Human Neutrophil Respiratory Burst Oxidase: Evidence for G Protein Regulation of the Binding of p67-phox and p47-phox. *J Biol Chem*. 268:8624-8631, 1992
- Uyama O, Yoshimoto Y, Yamamoto Y, Kawai A. Bone changes and carotid atherosclerosis in postmenopausal women. *Stroke*. 28:1730-1732, 1997.
- Vaya J, Aviram M, Mahmood S, Hayek T, Grenadir E, Hoffman A, Milo S. Selective distribution of oxysterols in atherosclerotic lesions and human plasma lipoproteins. *Free Radic Res*. 34:485-97, 2001
- Vaes G. Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. A review of recent developments on the formation, activation, and mode of action of osteoclasts. *Clin Orthop Relat Res*. 231:239-71, 1988.

- Vicca S, Hennequin C, Nguyen-Khoa T. Caspase-dependent apoptosis in THP-1 cells exposed to oxidized low-density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 273:948–954, 2000
- Watanabe T, Pakala R, Katagiri R, Benedict CR. Antioxidant N-Acetylcysteine Inhibits Vasoactive Agents-Potentiated Mitogenic Effect of Mildly Oxidized LDL on Vascular Smooth Muscle Cells. *Hypertens Res*. 25:311-315, 2002
- Watanabe T, Pakala R, Katagiri T, Benedict CR. Synergistic effect of urotensin II with mildly oxidized LDL on DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 104:16-18, 2001
- Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: Basic mechanisms oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*. 91:2488-2496, 1995
- Weidtmann R, Scheithe N, Hrboticky. Mildly oxidized LDL induces platelet aggregation through activation of phospholipase A2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 15:1131–1138, 1995
- Whitfield JF. Parathyroid hormone (PTH) and hematopoiesis: new support for some old observations. *J Cell Biochem*. 96:278-84, 2005
- Williams DL, Councilly MA, Cemel RE. Scavenger receptor B1 and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol*. 10:329-339, 1999
- Witztum J, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*. 88:1785–1792, 1991
- Woitge HW, Seibel MJ. Osteoporosis. Biochemical markers to survey bone turnover. *Rheum Dis Clin North Am*. 27:49-80, 2001
- Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski LA. Skeletal alterations in ovariectomized rats *Calcif. Tissue Int*. 37:324–328, 1985
- Wu R, Huang YH, Elinder LS, Frostegard J. Lysophosphatidylcholine is involved in the antigenicity of oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 18:626–630, 1998.
- Xie Q, Matsunaga S, Shi X, Ogawa S, Niimi S, Wen Z, Tokuyasu K, Machida S. Refolding and characterization of the functional ligand-binding domain of human lectin-like oxidized LDL receptor. *Protein Express Purif*. 32:68–74, 2003.
- Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med*. 15:212-216, 1976
- Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and cbfa1. *Endocrinology*. 21:393-411, 2000

Yamaguchi T, Sugimoto T, Yano S, Yamauchi M, Sowa H, Chen Q, Chihara K. Plasma lipids and osteoporosis in postmenopausal women. *Endocr J.* 49:211-217, 2002

Yamakawa T, Satoru E, Yamakawa T. Lysophosphatidylcholine stimulates MAP kinases activity in rat vascular smooth muscles cells. *Hypertension.* 31:248-253, 1998

Yang YX, Lewis JD, Epstein S, Metz DC. Long-term proton pump inhibitor therapy and risk of hip fracture. *JAMA.* 296:2947-53, 2006

Young, McEneny. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trst.* 29, 2001

Zaidi SK, Sullivan AJ, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Integration of Runx and Smad regulatory signals at transcriptionally active subnuclear sites. *Proc Natl Acad Sci.* 99:8048-8053, 2002

Zettler ME, Prociuk MA, Austria JA, Massaeli H, Zhong G, Pierce GN. OxLDL stimulates cell proliferation through a general induction of cell cycle proteins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284:H644-H653, 2003

Zhang FL, Casey PJ. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Ann Rev Biochem.* 65:241-269, 1996